

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. Andreas Neubauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Etablierung eines NSCLC-Modells zur Untersuchung der Rolle der p53 DNA Bindungskoooperativität für Zellschicksalsentscheidungen in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Robert Kahnis
aus Gummersbach

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24. Februar 2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. T. Stiewe

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Lill

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassungen.....	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary	2
2 Einleitung	5
2.1 Krebs und seine Entstehung.....	5
2.2 Der Tumorsuppressor p53.....	7
2.2.1 Aufbau und Struktur des p53 Proteins	8
2.2.2 Die kooperative Bindung von p53 an die DNA	10
2.2.3 Zellschicksalsentscheidungen durch p53.....	12
2.2.4 Mechanismen der differentiellen Genregulation durch p53	14
2.2.5 Die Rolle der p53 DNA Bindungskoopertivität und der p53-responsiven Elemente für die Zielgenselektion.....	16
2.2.6 Die Rolle der p53 DNA Bindungskoopertivität für die Tumorsuppression	18
2.2.7 Tumorsuppression durch p53 – welche Programme sind wichtig?.....	18
2.3 Genomeditierung mit maßgeschneiderten Endonukleasen	20
2.3.1 Übersicht über Endonukleasen zur Genomeditierung.....	21
2.3.2 Auswahl einer geeigneten Nuklease	23
2.4 Problemstellung und Ziele dieser Arbeit.....	23
3 Material	25
3.1 Organismen	25
3.1.1 Bakterienstämme	25
3.1.2 Zelllinien.....	25
3.2 Plasmide	25
3.3 Oligonukleotide	26
3.4 Lösungen, Puffer und Medien.....	27
3.5 Enzyme	30
3.6 Antikörper	30
3.7 Käufliche Kits	31
3.8 Größenmarker.....	31
3.9 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte	32
4 Methoden	33
4.1 Zellbiologische Methoden.....	33
4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen	33
4.1.2 Passagieren, Einfrieren, Auftauen.....	33

4.1.3	Zellzahlbestimmung	34
4.1.4	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen (H1299).....	34
4.1.5	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen (H1299).....	35
4.1.6	Isolation von Einzelzellklonen.....	35
4.1.7	Herstellung stabiler Zelllinien durch lentivirale Transduktion	35
4.1.8	Zellviabilitätsassay	36
4.1.9	Durchflusszytometrie	36
4.1.10	Tamoxifen-induzierbares ER ^{TAM} -System	37
4.1.11	Zielgerichtete Integration mit dem cellular Genome Positioning System (cGPS®).....	37
4.2	Analyse von DNA und Klonierungstechniken	40
4.2.1	Transformation von kompetenten E.Coli Bakterien	40
4.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus E.Coli	40
4.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop.....	41
4.2.4	Restriktionsanalyse von DNA.....	42
4.2.5	Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten	42
4.2.6	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	43
4.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	43
4.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	43
4.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	43
4.2.10	TOPO®-Zero-Blunt- und TOPO®-TA-Klonierung.....	45
4.2.11	Klonierung mit der Gateway®-Technologie.....	45
4.2.12	Sequenzierung von DNA.....	46
4.2.13	Isolation von genomischer DNA aus Zellen	46
4.3	Analyse von RNA.....	47
4.3.1	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	47
4.3.2	cDNA-Synthese.....	47
4.3.3	Quantitative PCR	47
4.4	Analyse von Proteinen.....	49
4.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	49
4.4.2	Bestimmung der Protein-Konzentration.....	49
4.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	49
4.4.4	Western Blot und Detektion	50
4.4.5	Luziferase Assay	51
5	Ergebnisse	52
5.1	Generierung eines Expressionssystems.....	52
5.1.1	Vorüberlegungen.....	52
5.1.2	Klonierung des modifizierten Östrogen-Rezeptors.....	53
5.1.3	Klonierung der Gaussia Luziferase	55

5.1.4	Klonierung der p53 H1-Helix-Mutanten.....	57
5.2	Etablierung von isogenen, stabil exprimierenden Zelllinien	59
5.2.1	Generierung eines Gateway- <i>Destination</i> -Vektors	59
5.2.2	Klonierung der Expressionsvektoren	60
5.2.3	p53-ER ^{TAM} wird in HEK293-Zellen exprimiert	61
5.2.4	Gaussia Luziferase wird aus allen Konstrukten exprimiert	62
5.2.5	p53-ER ^{TAM} aktiviert p53-spezifische Promotoren in Abhängigkeit der Stärke der Kooperativität.....	63
5.2.6	Selektion von Einzelklon-Zelllinien nach zielgerichteter Integration	64
5.2.7	PCR zur Identifizierung zielgerichteter Integration.....	65
5.2.8	HR+ Zelllinien weisen unterschiedliche Proteinlevel von p53 auf	65
5.2.9	HR+ Zelllinien sind nicht in der Lage, p21 ^{CDKN1A} als typisches p53 Zielgen zu aktivieren	66
5.2.10	Die H1-Helix-Mutationen zeigen in den HR+ Zelllinien keinen Einfluss auf die Zellviabilität	68
5.3	Etablierung eines NSCLC-Zellkulturmodells zur Untersuchung der p53 DNA Bindungskoopervativität.....	69
5.3.1	Generierung eines neuen Expressionsvektors	69
5.3.2	Markierung von H1299-Zellen mit einer Cypridina Luziferase	72
5.3.3	Herstellung monoklonaler Zelllinien.....	72
5.3.4	Die Aktivierung von p53 verändert die Zellviabilität	74
5.3.5	Die Stärke der Kooperativität beeinflusst die Induktion typischer p53- Zielgene auf mRNA-Ebene.....	76
5.3.6	Die Stärke der Kooperativität ist ausschlaggebend für die Induktion typischer p53-Zielgene auf Proteinebene	78
5.3.7	Koopervativität ist notwendig, um Apoptose als Reaktion auf DNA-Schäden auszulösen.....	80
5.3.8	Die Stärke der Kooperativität beeinflusst das Proliferationsverhalten	81
5.3.9	Gleichmäßigere Expression hebt Einfluss der Kooperativität für das Zellschicksal besser hervor	84
6	Diskussion	86
6.1	Erfolgreiche Klonierung und Validierung des Expressionssystems	86
6.2	Meganuklease-vermittelte zielgerichtete Integration	87
6.2.1	Meganuklease-vermittelte zielgerichtete Integration führte zu niedriger Rate an positiven Klonen in H1299 Zellen.....	87
6.2.2	Mögliche Gründe für die niedrige Rate an homologer Rekombination in H1299	87
6.2.3	Ansätze zur Erhöhung der Rekombinationsrate	89
6.2.4	Fehlerhafte Gegenselektion mit Ganciclovir als möglicher Grund für fehlende Isogenität.....	89

6.2.5	Fazit und Ausblick	90
6.3	Zur Etablierung eines NSCLC-Zellkulturmodells.....	91
6.3.1	Der Einfluss der p53 DNA Bindungskoooperativität auf das Zellschicksal im NSCLC-Zellkulturmodell.....	91
6.3.2	Genotoxischer Zellstress führt zu stärkeren p53-abhängigen Zellschicksalsentscheidungen.....	92
6.3.3	Unterschiedliche Expressionsniveaus der H1-Helix-Mutanten beeinflussen das Zellschicksal	93
6.3.4	Limitationen des Modells.....	93
6.3.5	Zusammenfassung und Stärken des Modells.....	94
6.4	Ausblick	95
7	Literaturverzeichnis	98
8	Abbildungsverzeichnis	113
9	Anhang.....	VII
	Lebenslauf [entfernt].....	VII
	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	VIII
	Danksagung	IX
	Ehrenwörtliche Erklärung [entfernt]	X

Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Abb.	Abbildung
AIP1	Apoptosis Inducing Protein 1
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
ASPP	Apoptosis Stimulating of p53 Protein
Att	Attachment Site
Bp	Basenpaare
Cdk2	Cyclin-dependent Kinase 2; Zyklin-abhängige Kinase 2
Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21)
CDT	C-Terminale Regulationsdomäne
CLuc	Cypridina Luziferase
cPARP	cleaved PARP
CRISPR	clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat
DA	Dalton
DBD	DNA Bindungsdomäne
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR5	Death Receptor 5
DSB	Doppelstrangbruch
DYRK2	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2
EE	p53 EE → R181E
EL	p53 EL → R181L
ER ^(TAM)	Östrogen-Rezeptor (Tamoxifen-induzierbar)
et al.	und andere
GCV	Ganciclovir
GLuc	Gaussia Luziferase
Hdm2	Humanes Analog zu Mdm2
HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase 2
HR	Homologe Rekombination
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
KanaR	Kanamycin-Resistenzgen
Mdm2	Mouse double minute 2
NeoR	Neomycin-Resistenzgen
NHEJ	Non homologous end-joining

p53 RE	p53-responsives Element
p53AIP1	p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PTM	post-translationale Modifikation
RE	p53 RE → E180R, R180E
RR	p53 RR → E180R
TAD	Transaktivierungsdomäne
TET	Tetramerisierungsdomäne
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
u.a.	unter anderem
WT	p53 Wildtyp: ER→ E180, R181
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 fungiert als eine zelluläre Drehschreibe, die eine Vielzahl von Stresssignalen erkennt und weiterverarbeitet. Über eine enge Kontrolle des Zellzyklus und des Zustands des Genoms sichert p53 die genomische Integrität einer Zelle und entscheidet durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor als Antwort auf zelluläre Stressoren über das Zellschicksal. Abhängig von Art und Ausmaß des Schadens, kann die Antwort von transientem Zellzyklusarrest mit Einleitung von DNA-Reparaturprogrammen über einen irreversiblen Zellzyklusstopp durch Seneszenz oder Differenzierung bis hin zur Entfernung der Zelle aus dem Organismus durch p53-vermittelte Apoptose reichen.

Für die Auswahl von Zielgenen und damit das p53-abhängige Zellschicksal spielt die p53 DNA Bindungskoooperativität eine entscheidende Rolle. p53 bindet als Tetramer kooperativ an die DNA. Die strukturelle Basis hierfür stellen intermolekulare Interaktionen zwischen den beiden gegensätzlich geladenen Aminosäureresten Glutamat 180 und Arginin 181 an der Helix H1 der DNA Bindungsdomänen von jeweils zwei p53 Monomeren dar. Mutationen an dieser Stelle können die Kooperativität und damit Bindungsaffinität von p53 an die DNA verringern bzw. erhöhen. Dies beeinflusst die Zielgenselektion, denn hohe Kooperativität erweitert das Zielgenspektrum auch auf Gene mit von der p53-Konsensussequenz abweichenden p53-responsiven Elementen. Während Zielgene, die in der Auslösung von Zellzyklusarrest involviert sind, meist kanonische p53 RE aufweisen und daher sowohl von niedrig- als auch hoch-kooperativem p53 transaktiviert werden können, finden sich in den Promotoren von Apoptose-fördernden Zielgenen weniger perfekte, niedrig-affine p53 Bindungsstellen, für deren Bindung daher hohe Kooperativität erforderlich ist.

Der Einfluss der Bindungskoooperativität auf das langfristige Proliferationsverhalten von Tumorzellen in vitro und in vivo konnte dabei bislang noch nicht vergleichend untersucht werden. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es daher, Zelllinien mit stabiler Expression von p53-Koooperativitätsmutanten zu etablieren, welche den Einfluss von Kooperativität auf das Zellschicksal abbilden und untersuchbar machen.

Hierzu wurde ein induzierbares p53-Expressionssystem mit den verschiedenen Kooperativitätsmutanten kloniert, die das ganze Spektrum der H1-Helix-Interaktionsstärken – von aufgehoben bis über dem physiologischen Niveau liegend – abdecken. Das System wurde weiterhin mit einem Reporter versehen, um die p53

Expression überwachbar zu machen. Die entstehenden Fusionsproteine wurden korrekt exprimiert und übten erst nach Aktivierung p53-spezifische Effekte aus.

Um eine optimale Vergleichbarkeit des Einflusses von Kooperativität auf das Zellschicksal herzustellen, wurde der Versuch unternommen, die p53 Konstrukte Endonuklease-vermittelt zielgerichtet in den Rag1 Genlokus p53-negativer H1299 Zellen zu integrieren. Dabei wird der zelluläre Reparaturmechanismus der homologen Rekombination ausgenutzt, um isogene Zelllinien zu generieren. Es zeigte sich eine sehr geringe Rekombinationsrate; zudem wiesen die positiv getesteten Klone unterschiedlich hohe p53-Proteinlevel und weiterhin keine induzierbare und effektive Aktivität von p53 auf. Daher eigneten sie sich nicht zur weiteren Untersuchung der Bindungskooperativität. Es lässt sich diskutieren, dass aufgrund verschiedener möglicher Gründe – z.B. dem epigenetischen Status des Rag1-Lokus oder Mutationen im DNA-Reparatursystem – Meganuklease-vermittelte zielgerichtete Integration in H1299 Zellen nur mit sehr geringer Effizienz möglich ist.

Daraufhin wurden durch konventionelle Transfektion und Selektion Zelllinien mit stabiler Expression der p53-Fusionsproteine generiert. Diese zeigten eine gute Expression der Konstrukte und nach Aktivierung von p53 starke, p53- und kooperativitätsabhängige Effekte. So zeigte sich bei der Untersuchung der langfristigen Auswirkung der Kooperativität auf die Proliferation eine mit steigender Kooperativität reduzierte Proliferationskinetik. Da die Zellen nicht isogen zueinander waren, zeigte sich in manchen der verwendeten Klone ein Einfluss der unterschiedlichen Proteinlevel auf das Zellschicksal, welche teilweise den Einfluss der Bindungskooperativität maskierte. Andererseits konnte aber auch verdeutlicht werden, dass dieses Modell bei sorgsamer Auswahl der Klone den Einfluss der p53 DNA Bindungskooperativität sehr gut abbilden kann. Daher eignet es sich sehr für weitere Experimente. Die Mechanismen p53-vermittelter Zellschicksalsentscheidungen zu verstehen, ist von großer Bedeutung, weshalb die weitere Erforschung der Bindungskooperativität – als ein Modulator dieser Entscheidungen – vorangetrieben werden sollte. Als eine der Möglichkeiten für weitere Untersuchungen mit diesem Modell bieten sich Xenograft-Studien an.

1.2 Summary

The tumor suppressor p53 acts as a cellular hub which processes a multitude of stress signals. By ensuring a tight control of the cell cycle and the state of the genome it acts as a safeguard of genomic integrity of a cell and - as an answer to cellular stresses - decides the cell's fate mainly through its function as a transcription factor. Depending on the type and extent of the damage, the answer can reach from transient cell cycle arrest

with concurrent start of DNA-repair programs to an irreversible cell cycle arrest by senescence or differentiation up to – ultimately – the removal of the cell from the organism via p53-mediated apoptosis.

p53 DNA binding cooperativity plays an important role for target gene selection and thus for p53-dependent cell fate. p53 binds DNA as a tetramer in a cooperative manner. The structural basis for cooperativity is constituted by intermolecular interactions between the two oppositely charged amino acid residues glutamate 180 and arginine 181 in the helix H1 of the DNA binding domains of two p53 monomers. Mutations of these residues can lower or raise cooperativity and therefore DNA binding affinity of p53. This influences target gene selection, because high cooperativity expands the target gene spectrum to genes with p53 response elements deviating from the p53 consensus sequence. While target genes involved in cell cycle arrest mostly display canonical response elements and can therefore be transactivated by both low- and high-cooperative p53, promoters of apoptosis-promoting target genes often show imperfect, low-affinity p53 binding sites which can only be bound by high-cooperative p53.

The influence of binding cooperativity on long-term proliferation behavior of tumor cells in vitro and in vivo has not been assessed comparatively yet. A primary objective of this work was therefore to establish cell lines with stable expression of p53-cooperativity mutants by means of which the entire spectrum of H1-Helix interactions strength and the associated impact on cell fate can be investigated.

For this purpose an inducible p53 expression system with the different cooperativity mutants, which spanned the entire spectrum of cooperativity – from abrogated up to higher than physiological – was cloned. Furthermore, the system was labeled with a reporter, in order to monitor p53 expression. The created fusion proteins were expressed correctly and exerted p53-specific effects only after activation.

For an optimal comparability of the influence of cooperativity on cell fate, it was attempted to integrate the p53 construct into a given locus in p53-null H1299 cells by means of gene targeting; this means endonuclease-mediated targeted integration into the Rag1 locus via homologous recombination to generate isogenic cell lines. The recombination rate was very low; furthermore the positively tested clones exhibited different p53-protein levels and did not show inducible and effective activity of p53. Thus, they were not suitable for further investigation of binding cooperativity. It can be presumed that because of a variety of reasons – e.g. the epigenetic status of the Rag1 locus or mutations in the DNA repair system – Meganuclease-mediated targeted integration in H1299 cells is only possible with very low efficiency.

Thereupon additional cell lines with a stable expression of p53 fusion constructs were generated through conventional transfection and selection. They exhibited good

expression of the constructs and strong p53- and cooperativity dependent effects on the cell fate upon p53 activation. For instance, cells showed reduced proliferation kinetics with increasing cooperativity. However, due to the fact that cells were not strictly isogenic, it could be observed that in some of the used clones different protein levels showed an effect on the cellular outcome upon p53 activation which in part masked influence of binding cooperativity. On the other hand, it could also be clarified that by means of careful selection of clones this model can display the influence of p53 DNA binding cooperativity very well. Hence, it is very suitable for additional experiments. Understanding the mechanisms of p53-mediated cell fate decisions is of great importance, thus further research on binding cooperativity as one modulator of these decisions should be conducted. There is a variety of possibilities for further investigations with this model, of which I suggest xenograft studies.

2 Einleitung

2.1 Krebs und seine Entstehung

In einem gesunden Organismus sind verschiedenartig differenzierte Zellen in Verbänden zu Geweben organisiert. An vielen Stellen im Körper ist es wichtig, dass diese Gewebe sich physiologisch regenerieren, also alte und abgestorbene Zellen durch neue ersetzt werden. Dies setzt eine gut kontrollierte Homöostase zwischen Wachstum und Sterben voraus – es darf also weder zu viel Gewebe wachsen noch dürfen dauerhaft mehr Zellen sterben als ersetzt werden können. Doch nicht nur innerhalb der Gewebe existiert dieses Gleichgewicht, auch innerhalb einer einzelnen Zelle werden ständig pro- und antiproliferative Signale integriert und müssen in feiner Balance gehalten werden. Krebs entsteht – vereinfacht gesagt – wenn dieses Gleichgewicht gestört wird, einzelne Zellen aus dem organisierten Verband ausbrechen und unempfindlich werden für die unzähligen Regulationsmechanismen, die sie normalerweise kontrollieren.

Die Transformation einer normalen hin zu einer hoch malignen Tumorzelle erfolgt über einen oftmals jahrelangen Zeitraum und ist statistisch gesehen ein sehr seltenes Ereignis. Angesichts der Zahl von 10^{16} Zellen, die im Laufe eines Lebens entstehen und einem Zellaustausch von bis zu 10^7 Zellen pro Sekunde bleibt dennoch ein großes Risiko, im Laufe eines Lebens an Krebs zu erkranken (Weinberg, 2014). Tumorprogression ist als mehrstufiger Prozess zu verstehen, in dem eine Zelle bestimmte Eigenschaften und Fähigkeiten, die sie als Tumorzelle auszeichnen und ihr Selektionsvorteile verschaffen, erwirbt. Dies geschieht durch eine Abfolge von mehreren Mutationen oder epigenetischen Modifikationen in Genen, die zumeist in der Regulation von Proliferation und Überleben involviert sind. Hanahan und Weinberg (2000) definierten zunächst sechs dieser Krebs kennzeichnenden Fähigkeiten: Erstens die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die normale Zellen benötigen, also die Fähigkeit zur autarken Proliferation. Zweitens, die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen, welche in normalen Zellen die externen Wachstumssignale ausbalancieren. Drittens müssen Tumorzellen den kontrollierten Zelltod (Apoptose) umgehen können, durch welchen kranke und alte Zellen normalerweise aus dem Organismus entfernt werden. Humane Zellen können sich physiologischerweise nur einer begrenzten Zahl von Teilungen unterziehen und stellen dann das Wachstum ein (Hayflick-Limit). Tumorzellen müssen daher viertens eine unendliche Teilungsfähigkeit erwerben und damit immortal werden. Wie auch alle anderen Gewebe benötigen Tumoren Blutgefäße, um mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden. Damit die Blutversorgung mit dem in späteren Stadien oft

schnellen Tumorwachstum mithalten kann, müssen Tumorzellen daher fünftens die Fähigkeit erwerben, das Wachstum von Gefäßen zu induzieren (Angiogenese). Während benigne Wucherungen nur eine oder manche dieser Eigenschaften aufweisen, zeigen maligne Tumoren meist alle. Der entscheidende Unterschied, der nur maligne Zellen auszeichnet, ist jedoch sechstens die Fähigkeit zur Invasion von Nachbargeweben und Metastasierung.



Abb. 2-1: Eigenschaften und Fähigkeiten, die Krebszellen auszeichnen. Sechs kennzeichnende Fähigkeiten (kF), für deren Erwerb eine einzelne Zelle eine große Zahl von Mutationen in einer Vielzahl von Genen erfahren muss. Genomische Instabilität und Tumor-begleitende Entzündung befähigen und unterstützen die Zellen bei dieser genetischen Evolution (befähigendes Merkmal, bM). In Tumorzellen anzutreffender veränderter Energiestoffwechsel sowie die Fähigkeit dieser Zellen, einer Beseitigung durch das Immunsystem zu entkommen sind ebenfalls kennzeichnende Fähigkeiten, deren abschließende Relevanz und Eigenständigkeit aber noch Gegenstand aktueller Forschung sind (modifiziert nach: Hannahan und Weinberg, 2011: Hallmarks of Cancer: The Next Generation).

Für den Erwerb all dieser Eigenschaften ist eine sehr große Anzahl an Mutationen in zahlreichen Genen notwendig. Diese sind aber aufgrund effizienter Kontrollmechanismen von Natur aus selten, weswegen es als wahrscheinlich angesehen wird, dass genetische Instabilität in einem frühen Stadium der Tumorigenese auftreten muss (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Schmitt et al., 2012). Tatsächlich hat die Sequenzierung von DNA aus Tumorzellen ergeben, dass in den meisten humanen Krebsarten mehrere tausend Mutationen anzutreffen sind (Schmitt et al., 2012). Mutationen in Genen, die in der DNA Reparaturmaschinerie oder in der Überwachung derselben involviert sind, spielen hier

vermutlich eine zentrale Rolle (Hanahan and Weinberg, 2011; Negrini et al., 2010; Schmitt et al., 2012).

Die Gene, die von Mutationen betroffen sind und dann zu den erwähnten Fähigkeiten beitragen, können in zwei Klassen eingeteilt werden: Zum einen die Protoonkogene, deren Genprodukte physiologischerweise die Zellproliferation fördern oder Apoptose unterdrücken. Durch Mutationen kann es z.B. zur erhöhten Produktion dieser Proteine oder zur dauerhaften Aktivierung selbiger kommen, so dass es zur aberranten, deregulierten Funktion kommt (Balmain, 2001; Bishop, 1981; Croce, 2008). Zum anderen die große Gruppe der Tumorsuppressorgene: Diese teilen als gemeinsames Merkmal, durch ihre normale Funktion die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von entarteten Zellen zu verringern (Weinberg, 2014). Dies geschieht beispielsweise durch hemmende Einflüsse auf die Zellproliferation, durch die Kontrolle genomischer Integrität – z.B. durch DNA-Reparatur Gene – und Einleitung von Apoptose, falls diese Integrität schwer gestört ist. Kommt es hier zu inaktivierenden Mutationen in beiden Allelen, fallen die entsprechenden Schutzmechanismen weg (Sherr, 2004). Mutationen in Protoonkogenen müssen daher auf dem Weg der Tumorigenese mit Mutationen in Tumorsuppressorgenen zusammentreffen, um ihren vollen Effekt entfalten zu können (Fearon und Vogelstein, 1990; Hanahan und Weinberg, 2000).

Die therapeutischen Möglichkeiten von Krebs sind in den letzten Jahren stetig gewachsen. Mittlerweile umfassen sie neben den klassischen Methoden – Operation, Bestrahlung oder chemotherapeutische Behandlung mit für alle Körperzellen schädlichen Substanzen – auch neue Medikamente, die gezielt Merkmale von Tumorzellen angreifen, andere Zellen schonen und daher oft weniger Nebenwirkungen aufweisen. Auch Strategien zur Modulation und Reaktivierung des Tumorsuppressors p53 sind in der Entwicklung. Dies unterstreicht die Notwendigkeit des exakten Verständnisses der zugrundeliegenden Mechanismen der Krebsentstehung.

2.2 Der Tumorsuppressor p53

Eines der bedeutendsten Mitglieder der Familie der Tumorsuppressoren ist das vom Gen TP53 kodierte Protein p53. In 50 % aller sporadischen Tumoren ist p53 durch Mutation, in fast allen weiteren durch andere Mechanismen inaktiviert. Patientinnen und Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom – bei dem eine erbliche Keimbahnmutation eines p53 Allels vorliegt – leiden an deutlich erhöhter Krebsinzidenz und p53-null Mäuse zeigen einen stark tumorbelasteten Phänotyp (Brady und Attardi, 2010; Olivier et al., 2010). Diese Umstände zeigen, dass p53 für die Tumorsuppression eine entscheidende Rolle spielt und eine Zelle sich im Laufe ihrer Transformation seiner hindernden Einflüsse entledigen muss.

Diese zentrale Bedeutung des als Transkriptionsfaktor fungierenden p53 liegt in seiner Stellung als zelluläre Drehscheibe, die eine Vielzahl von Stresssignalen erkennt und weiterverarbeitet, begründet. Zu diesen Stressoren zählen beispielsweise akute und chronische DNA-Schädigung, Onkogen-Aktivierung oder Hypoxie – also Umstände, die eine Transformation einer normalen zu einer malignen Zelle einleiten oder unterhalten können (Übersicht in Bieging et al., 2014). Über eine enge Kontrolle des Zellzyklus und des Zustands des Genoms sichert p53 die genomische Integrität einer Zelle. Die schädigenden Stimuli führen über Mediatorproteine zu einer Aktivierung von p53, welches dann wiederum über eine Induktion von Effektorproteinen eine zelluläre Antwort einleitet (Übersicht in Riley et al., 2008). Diese reicht von einem transienten Zellzyklusarrest mit Einleitung von DNA-Reparaturprogrammen über einen irreversiblen Zellzyklusstopp durch Seneszenz oder Differenzierung bis hin zur Entfernung der Zelle aus dem Organismus durch p53-vermittelte Apoptose (Brady und Attardi, 2010; Riley et al., 2008; Schlereth et al., 2010b; Stiewe, 2007). Diese Balance zwischen Leben und Tod ist äußerst eng reguliert und wie p53 diese in die eine oder andere Richtung verändern kann, ist Gegenstand aktueller Forschung. Zudem vergrößert sich das bekannte Universum von durch p53 hervorgerufenen Antworten auf diese Stressoren zunehmend: So stellen u.a. auch Modulationen im zellulären Energiemetabolismus, verstärkte Autophagie oder Differenzierung Mechanismen der p53-vermittelten Tumorsuppression dar (Bieging et al., 2014; Vousden und Prives, 2009; Vousden und Ryan, 2009).

2.2.1 Aufbau und Struktur des p53 Proteins

p53 übt seine Funktionen hauptsächlich als Transkriptionsfaktor aus und weist in seinem Aufbau die dafür typischen Strukturen auf: Zwei N-terminale Transaktivierungsdomänen, eine zentrale DNA-Bindungsdomäne, eine Tetramerisierungs- und eine C-terminale Regulationsdomäne (Harms und Chen, 2006; Joerger und Fersht, 2008).



Abb. 2-2: Schematischer Aufbau des p53 Proteins. Zwei N-terminale Transaktivierungsdomänen (TAD), eine zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD), ein Kernlokalisierungssignal (KLS), eine Tetramerisierungsdomäne (TET) sowie eine C-Terminale Regulationsdomäne (CDT) bilden zusammen das p53 Protein. Angegeben ist außerdem die Anzahl der Aminosäuren sowie eine Prolinreiche Region (PRR), die Teil der zweiten Transaktivierungsdomäne ist (modifiziert nach Harms und Chen, 2006; Joerger und Fersht, 2008).

Die N-terminale Region mit den beiden Transaktivierungsdomänen (TAD) stellt sich in der höheren Proteinstruktur ungefaltet dar, was die Bindung der zahlreichen mit dieser Region interagierenden Proteine erleichtert. Sowohl die negativen Regulatoren von p53, Mdm2 und Mdm4 sowie transkriptionelle Co-Faktoren und Teile des Transkriptionsapparates binden hier (Joerger und Fersht, 2008). Die beiden TAD unterscheiden sich hierbei in ihrer regulatorischen Funktion; während TAD1 essentiell für die Transaktivierung von Zellzyklusarrest-Genen ist, zeigte sich TAD2 als notwendig für die Auslösung von Apoptose (Harms und Chen, 2006; Johnson et al., 2005).

Die Bedeutung der zentralen, sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (DBD) für die Funktion von p53 wird durch den Umstand unterstrichen, dass 86 % aller Mutationen in dieser Region anzutreffen sind (Olivier et al., 2010). Sie ist als β -Sandwich aufgebaut, welches als Gerüst für die daran angeschlossenen DNA-bindenden Regionen dient. Diese können unterteilt werden in ein an die große Furche bindendes (L1) Schleifen-Faltblatt-(H2) Helix Motiv sowie zwei große (L2 & L3) Schleifen, die an die kleine Furche der DNA binden (Cho et al., 1994; Joerger und Fersht, 2008).

Die Transaktivierung von Zielgenen erfolgt über die sequenzspezifische Bindung der p53 DBD an Erkennungssequenzen in den Promotoren dieser Gene. Die p53 Konsensussequenz lautet 5'-RRRCWWGYYY-3' (wobei R=A oder G, Y=C oder T, W=A oder T; G=Guanin, C=Cytosin, A=Adenin, T=Thymin) (el-Deiry et al., 1992; Funk et al., 1992). Zumeist bilden zwei solcher als *half-sites* bezeichneten Sequenzen, getrennt durch einen 0-21 bp langen *Spacer* ein p53-responsives Element (p53 RE), auch als *full-site* bezeichnet (Riley et al., 2008). Sowohl die *quarter-sites* einer jeden *half-site* als auch die beiden *half-sites* sind in ihrer Sequenz palindromisch zueinander.

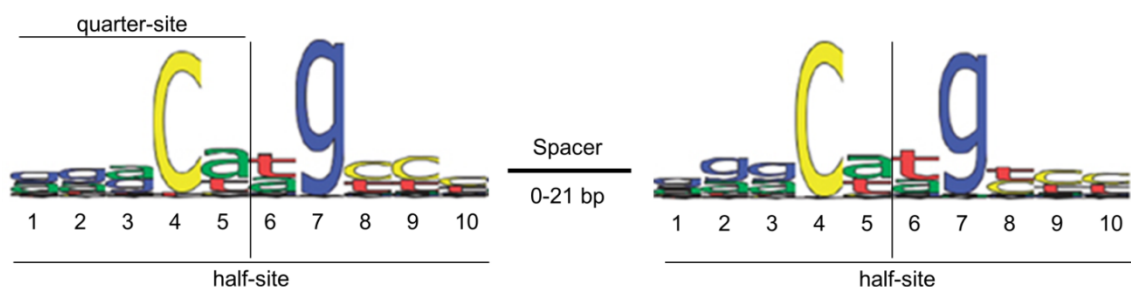


Abb. 2-3: Struktur der p53 Konsensussequenz. Zwei decamere *half-sites* sind durch *Spacer* variabler Länge miteinander verbunden und bilden zusammen eine *full-site*. Jede *half-site* kann nochmals in zwei *quarter-sites* unterteilt werden. Besondere Bedeutung für die Affinität von p53 an die Bindungsstelle kommt dem zentralen CWWG Motiv zu (modifiziert nach Riley et al., 2008).

Diese Symmetrie der Erkennungssequenz aus vier *quarter-sites* spiegelt sich in der Bindung an die DNA wieder. Diese wird nicht als Monomer, sondern kooperativ durch ein aus vier p53-Molekülen gebildetes Tetramer gebunden (McLure und Lee, 1998; Weinberg

et al., 2004). Die strukturelle Basis für diese Oligomerisierung ist die Tetramerisierungsdomäne (TET) in der C-terminalen Region des Proteins, welche aus einem kurzen β -Strang und einer α -Helix aufgebaut ist. Co-translational bildet sich über intermolekulare Interaktionen durch ein antiparalleles β -Faltblatt und ein α -Helix-Bündel aus zwei Monomeren ein symmetrisches Dimer. Zwei dieser Dimere binden sequenzspezifisch jeweils eine decamere *half-site* der Erkennungssequenz und bilden so das Tetramer – dieses kann also als Dimer aus zwei Dimeren beschrieben werden (Kitayner et al., 2006; Malecka et al., 2009; Rippin et al., 2002; Tidow et al., 2007). Diese Dimer-Dimer Bindung wird u.a. an der Tetramerisierungsdomäne über hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäurereste Leu344 und Leu348 vermittelt (Jeffrey et al., 1995; Joerger und Fersht, 2008; Weinberg et al., 2004). **Abb. 2-4** zeigt die Struktur von vier p53 DBD gebunden an die DNA.

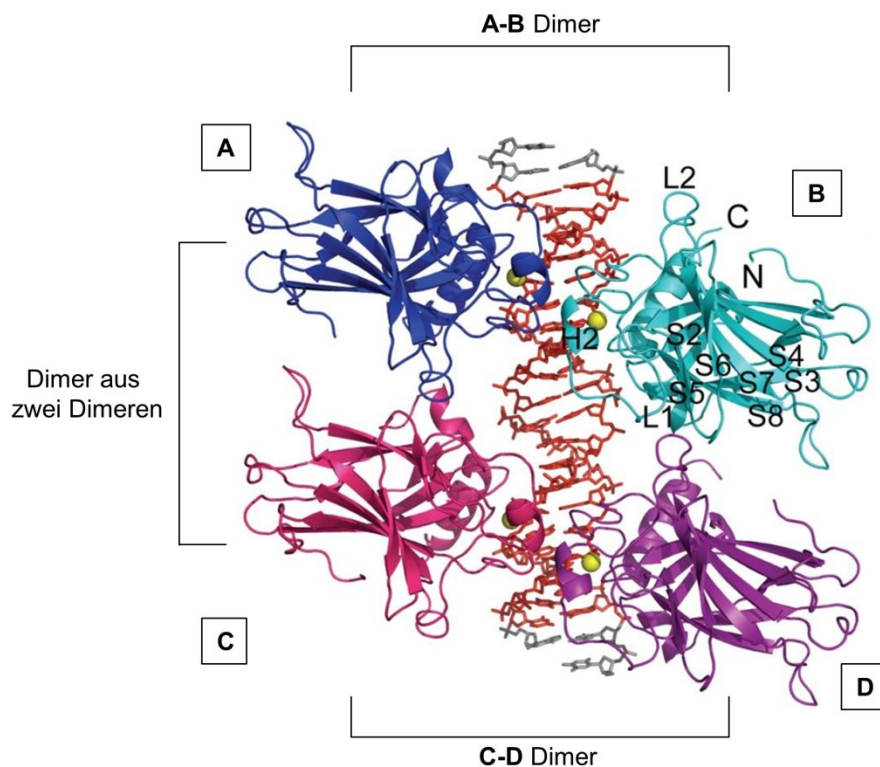


Abb. 2-4: Struktur eines tetrameren p53 DBD-DNA Komplexes. Je zwei p53 Monomere bilden ein symmetrisches Dimer (A&B; C&D) und binden eine decamere *half-site* der p53 Erkennungssequenz an der DNA (rot). Zwei dieser Dimere bilden zusammen ein p53 Tetramer. Gezeigt ist nur die Struktur der DBD (modifiziert nach Malecka et al., 2009)

2.2.2 Die kooperative Bindung von p53 an die DNA

Kooperative Bindung beschreibt, dass die Bindungsaffinität eines p53 Dimers oder Tetramers zur DNA größer ist als die Summe der einzelnen Monomere. Zwar wird die Tetramerbildung über verschiedene Protein-Protein Interaktionen an der C-terminalen

Tetramerisierungsdomäne vermittelt, jedoch konnte gezeigt werden, dass auch p53 Mutanten ohne diese Domäne als Tetramer an p53 RE bestehend aus zwei decameren *half-sites* binden (Weinberg et al., 2004). Vielfältige inter-dimerische als auch intra-dimerische intermolekulare Interaktionen der DBD stabilisieren hierbei das Tetramer (Kitayner et al., 2006). Als entscheidend für die kooperative Bindung von p53 an die DNA erwies sich jedoch die intra-dimerische Interaktion zwischen zwei gegensätzlich geladenen Aminosäureresten (Glu180, Arg181; kurz E180, R181) an der Helix H1. Hier bildet sich eine doppelte Salzbrücke aus, welche das Dimer zusätzlich stabilisiert. Fällt diese Salzbrücke durch an dieser Stelle eingeführte Mutationen weg, reduziert sich die Bindungsaffinität von p53 an die DNA deutlich (Dehner et al., 2005; Schlereth et al., 2010a).

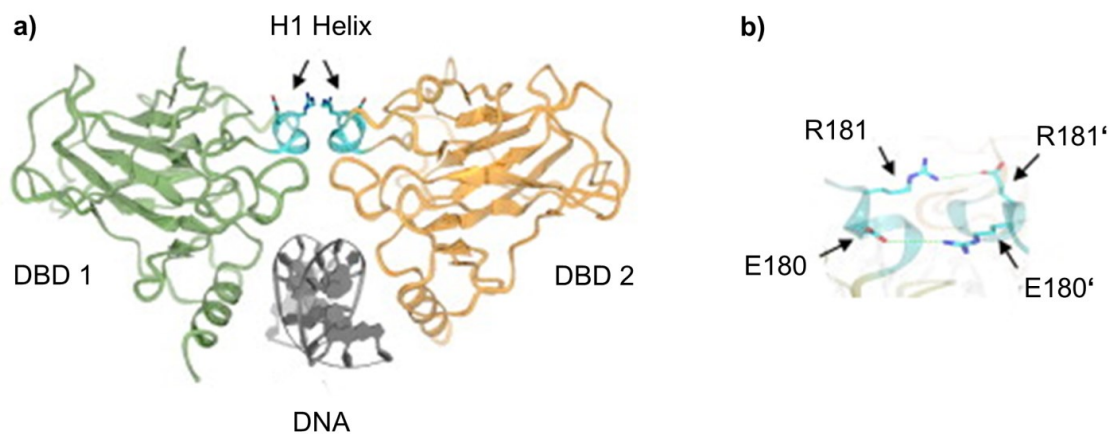


Abb. 2-5: Intra-dimerische H1-Helix Interaktionen. a) Struktur von zwei p53 DBD in einem symmetrischen Dimer in Kontakt mit DNA. Die Interaktion zwischen den beiden H1-Helices (blau) vermittelt die kooperative Bindung an die DNA. b) Vergrößerte Ansicht der Interaktionsfläche an der H1-Helix mit den beiden Aminosäureresten E180 und R181 der DBD 1 respektive E180' und R181' der DBD 2 (Schlereth et al., 2010a).

In dieser Arbeitsgruppe wurde ein Spektrum von p53 H1-Helix Mutanten generiert, welches von aufgehobener über reduzierte bis zu über dem physiologischen Niveau liegender Interaktion zwischen den Aminosäureresten der beiden H1-Helices reicht. Mutationen an der H1-Helix stören dabei nicht die Tetramerisierung von p53 an sich, sondern senken bzw. verstärken die DNA-Bindungsaffinität durch veränderte Kooperativität. Die Mutante R181E (im folgenden EE genannt) weist vier gleichsam negativ geladene Aminosäurereste auf, was die Interaktion an der H1-Helix und die Bindung an die DNA massiv herabsetzt. In der Mutante E180R (=RR) interagieren vier positiv geladene Aminosäurereste miteinander, was die Interaktion und Kooperativität zwar partiell reduziert, jedoch nicht so massiv wie bei der Mutante EE. Die Mutante R181L (=EL) steht im Kooperativitätsspektrum durch den neutralen Leucinrest in der Mitte,

während die E180R;R181E (=RE) eine höhere Bindungsaffinität als der Wildtyp aufweist. Wird in einer Zelle sowohl EE als auch RR exprimiert, wird der die Kooperativität mindernde Effekt durch Paarung dieser zwei gegensätzlich geladenen p53-Moleküle wieder aufgehoben. Das Resultat ist eine besonders starke kooperative Bindung an die DNA (Schlereth et al., 2010a). **Abb. 1-6** zeigt schematisch die H1-Helix Mutanten.

Die Interaktionen an der H1-Helix stellen die strukturelle Basis der kooperativen Bindung von p53 an die DNA dar und ermöglichen die Bindung an auch weniger perfekte p53-responsive Elemente. Diese Eigenschaft von p53 zeigte sich als wichtig für die Auswahl von Zielgenen als Antwort auf zellulären Stress. Die Stärke der Kooperativität spielt hierbei eine entscheidende Rolle (siehe unten und Beno et al., 2011; Schlereth et al., 2010a; Weinberg et al., 2005).

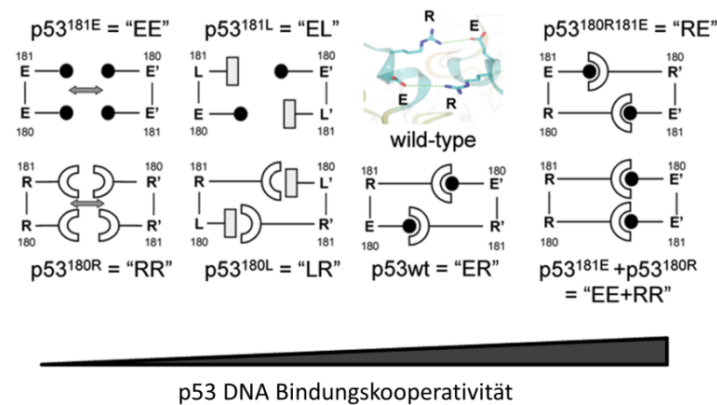


Abb. 2-6: Spektrum von p53 H1-Helix Mutanten mit veränderter Kooperativität. Die Mutante EE mit vier gleichsam negativ geladenen Glutamatresten zeigt dabei kaum noch nachweisbare DNA-Bindung, während RE und die Kombination aus EE+RR eine über dem physiologischen Niveau des Wildtyps liegende Kooperativität und Bindung an die DNA aufweisen (Schlereth et al., 2010b).

2.2.3 Zellschicksalsentscheidungen durch p53

Um geschädigte Zellen der Proliferation zu entziehen, kann p53 – wie eingangs beschrieben – als Antwort auf zelluläre Stressoren ein Spektrum an Programmen einleiten, dass von transientem Zellzyklusarrest bis zu Apoptose reicht.

Zellzyklusarrest in der G1-Phase wird über p21^{CDKN1A} vermittelt, welches hauptsächlich als Inhibitor des Komplexes von Cyclin E/Cdk2 die Progression von G1 nach S verhindert (Gartel et al., 1996). GADD45 und Protein 14-3-3 σ sind ebenfalls Zielgene von p53 und induzieren einen Zellzyklusarrest in G2, wobei GADD45 zusätzlich noch in der DNA-Reparatur involviert ist (Hermeking et al., 1997; Wang et al., 1999). Über diese Mechanismen ermöglicht p53 einer Zelle also die Reparatur von DNA-Schäden und das darauffolgende Wiedereintreten in die Proliferation.

Ebenfalls ist es aber möglich, dass eine Zelle der Proliferation irreversibel entzogen wird, was über drei Mechanismen – terminale Differenzierung, Seneszenz und Apoptose – funktionieren kann.

Der intrinsische Weg der Apoptose wird über die Freisetzung von Cytochrom C durch Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran eingeleitet. Verschiedene anti- (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L) und pro-apoptotische (z.B. Bax und die BH3-only Proteinfamilie mit Puma und Noxa) Faktoren bilden ein den Cytochrom-C-Ausstrom kontrollierendes Gleichgewicht. Nach Aktivierung und Stabilisierung durch diverse Stresssignale verschiebt p53 dieses Gleichgewicht durch Induktion dieser und weiterer pro-apoptotischer sowie durch Hemmung der anti-apoptotischen Proteine, so dass es zur Freisetzung von Cytochrom C und Einleitung der Apoptose kommt (Chipuk und Green, 2006; Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000a; Villunger et al., 2003). Eine transkriptionsunabhängige Aktivierung von Bax und Bak durch eine Konformationsänderung durch p53 direkt am Mitochondrium trägt ebenfalls zur pro-apoptotischen Funktion von p53 bei (Chipuk und Green, 2006; Chipuk et al., 2004). Zusätzlich beeinflusst p53 über Induktion der Todesrezeptoren DR5 und FAS (Death Receptor 5)(Ruiz-Ruiz et al., 2003; Takimoto und El-Deiry, 2000) und des DR5 Liganden TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) (Kuribayashi et al., 2008) auch den extrinsischen Weg der Apoptose.

Über die Induktion von PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) und p21^{CDKN1A} kann p53 als Antwort auf Stressoren Zellen auch in die Seneszenz treiben (Kortlever et al., 2006). Senescente Zellen befinden sich in einer Art Ruhezustand und sind der Proliferation permanent entzogen. Zusätzlich kann das Immunsystem durch p53-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen diese Zellen erkennen und eliminieren, so dass p53-vermittelte Seneszenz einen wichtigen Mechanismus der Tumorsuppression darstellt (Collado und Serrano, 2010; Serrano, 2011; Xue et al., 2007).

Neben diesen „klassischen“ Mechanismen tragen aber auch weitere Funktionen von p53 zur Tumorsuppression bei. Unter diesen finden sich u.a. Modulationen des Energiestoffwechsels, welche z.B. den Warburg-Effekt in Krebszellen durch Inhibition der Glykolyse über das Protein TIGAR antagonisieren (Bensaad et al., 2006) oder für vermehrten Flux durch die oxidative Phosphorylierung über Sco2 (Matoba et al., 2006) sorgen, sowie Unterdrückung der Umprogrammierung differenzierter somatischer Zellen in pluripotente Stammzellen (Choi et al., 2011; Lin et al., 2012). **Abb. 2-7** illustriert die zentrale Stellung von p53 als Knotenpunkt, der zelluläre Stresssignale integriert und verarbeitet.

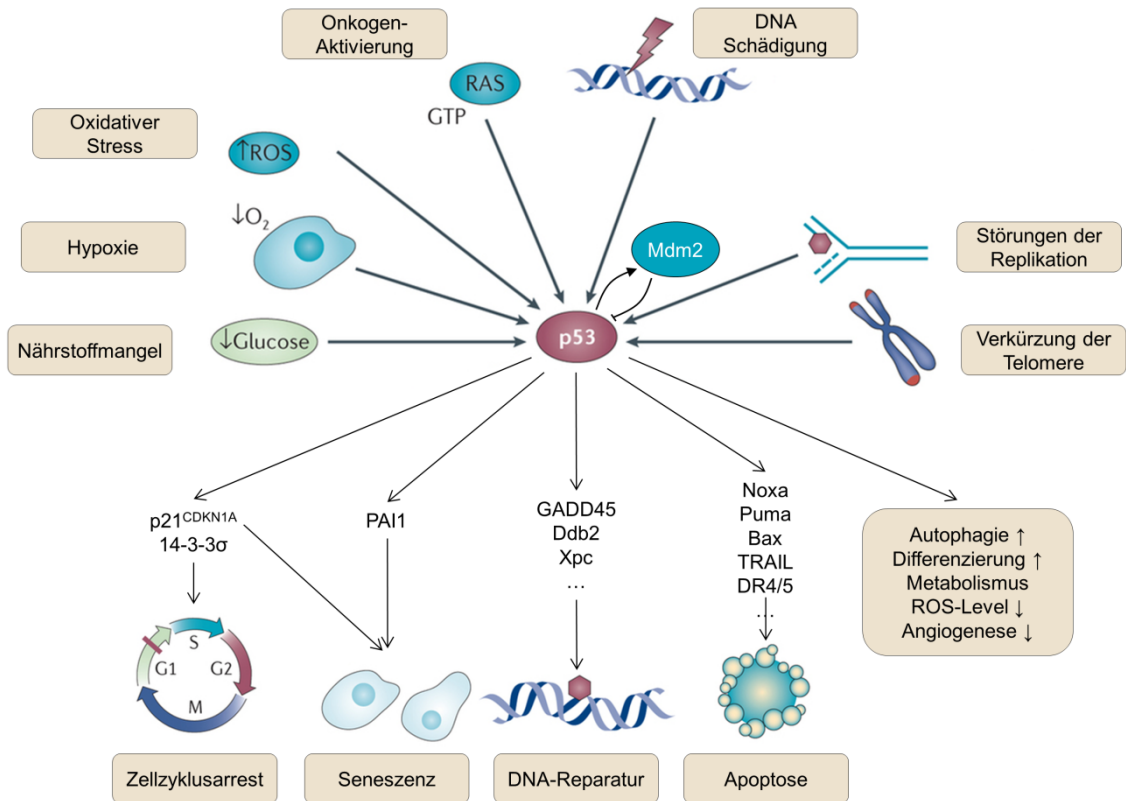


Abb. 2-7: Das p53 Netzwerk. Durch unterschiedliche Arten von Stress wird p53 über Mediatorproteine aktiviert. Es kommt zu vermindertem Abbau durch seinen Gegenspieler Mdm2 und damit zur Akkumulation von p53 in der Zelle, welches dann – reguliert durch eine Vielzahl an Mechanismen – über eine Induktion oder Repression seiner Zielgene das zelluläre Schicksal verändert. Alle so induzierten Programme haben eine tumorsuppressive Funktion gemeinsam (verändert nach Bieging et al., 2014)

Kommt es zu zellulärem Stress laufen jedoch nicht alle diese Programme gleichzeitig ab. Gerade für den Erfolg von chemotherapeutischen Behandlungen ist es aber essenziell, das Zellschicksal so zu modulieren, dass eine Tumorzelle der Proliferation für immer entzogen wird. Das Verständnis davon, wie p53 als Antwort auf diverse zelluläre Stressoren zwischen der immensen Anzahl seiner Zielgene und damit zwischen den verschiedenen zellulären Schicksalen entscheidet, ist daher von großer Bedeutung.

2.2.4 Mechanismen der differentiellen Genregulation durch p53

Die Zielgenselektion durch p53 wird äußerst vielschichtig reguliert. Im Folgenden sind die wichtigsten Regulationsebenen und exemplarische Beispiele genannt.

2.2.4.1 Post-Translationale Modifikationen

p53 selber ist Gegenstand zahlreicher post-translationaler Modifikationen (PTM), die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Neddylierung und Sumoylierung umfassen.

In der ungestressten Zelle werden die p53 Proteinspiegel auf einem niedrigen Niveau gehalten, in dem die E3 Ubiquitin Ligase Mdm2 im Zusammenspiel mit dem verwandten Protein MdmX p53 durch Ubiquitinierung am C-terminalen Ende der proteasomalen Degradation freigibt (Honda et al., 1997). Zudem bindet Mdm2 an der TAD von p53 und hemmt auf diese Weise die transkriptionelle Aktivität. Nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung induziert p53 selber die Expression von Mdm2 (Wu et al., 1993). Durch zellulären Stress, beispielsweise einer DNA-Schädigung, kommt es zu einer durch dafür sensible Kinasen (ATM/CHK2) zur Phosphorylierung von p53 an den Serinen S15 und S20 – dies blockiert die Bindung von Mdm2 – und zum anderen zur C-Terminalen Acetylierung durch p300, was die Ubiquitinierung und damit die Degradation verhindert (Craig et al., 1999; Ito et al., 2001). So steigen die p53-Spiegel nach akuter DNA-Schädigung sehr schnell an und das p53-Level alleine beeinflusst bereits das Zellschicksal (s.U.)

Andere PTM fungieren hingegen als eine Art binärer Schalter, welche das Zellschicksal selektiv beeinflussen (Gu und Zhu, 2012). Phosphorylierung an Ser46 durch HIPK2, p38 oder DYRK2 nach schwerem genotoxischem Schaden führt zu einer selektiv verstärkten Induktion von pro-apoptotischen (wie p53AIP1), nicht aber pro-Arrest Genen durch p53 (D'Orazi et al., 2002; Oda et al., 2000b; Taira et al., 2007). Eine Acetylierung an K120 durch Tip60 erhöht ebenfalls die Bindung an pro-apoptotische Zielgene (Tang et al., 2006) während eine Acetylierung/Ubiquitinierung an K320 durch den p300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF) bzw. E4F1 wichtig für die Induktion von p21^{CDKN1A}, nicht aber pro-apoptotischen Genen ist (Knights et al., 2006; Le Cam et al., 2006). Neben den genannten existieren noch weitere PTM, welche die Promotorselektivität beeinflussen (Übersicht in Carvajal und Manfredi, 2013; Schlereth et al., 2010b).

2.2.4.2 p53 Protein Level und Kinetik

Hohe Level an p53 lenken das Zellschicksal in Richtung Apoptose, weil dann eher das Gleichgewicht zugunsten der pro-apoptotischen Proteine kippt, während niedrige Level eher Zellzyklusarrest induzieren (Chen et al., 1996; Kracikova et al., 2013). Neuere Erkenntnisse weisen zudem darauf hin, dass die Kinetik der p53 Spiegel nach DNA-Schädigung das zelluläre Schicksal steuert: Milder DNA-Schaden führt zu kurzen, niedrigen Pulsen an p53 und induziert Zellzyklusarrest und Reparatur, während dauerhaft erhöhte p53 Spiegel zu Apoptose und Seneszenz führen (Purvis et al., 2012; Zhang et al., 2009).

2.2.4.3 Protein-Protein Interaktionen

Es existieren zahlreiche p53-bindenden Proteine, die das Zellschicksal beeinflussen. Ein gut erforschtes Beispiel ist die ASPP (Apoptosis Stimulating of p53 Protein) Familie. ASPP 1 und 2 binden in der DBD von p53 und erhöhen die DNA-Bindung und

Transaktivierung von p53 an pro-apoptotische Promotoren (v.A. Bax), während iASPP (Inhibitor of ASPP) durch seine Bindung das Gegenteil bewirkt (Bergamaschi et al., 2003; Samuels-Lev et al., 2001). Ein Beispiel für einen Co-Faktor, der das Gleichgewicht in Richtung Überleben lenkt, ist das hämatopoetische Zinkfinger Protein (HZF). In einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife bewirkt das durch p53 selbst induzierte Protein durch Bindung an die p53 DBD die präferentielle Transaktivierung von CDKN1A und 14-3-3 σ (Das et al., 2007).

2.2.5 Die Rolle der p53 DNA Bindungskoopertivität und der p53-responsiven Elemente für die Zielgenselektion

Für die kooperative Bindung von p53 an die DNA sind die H1-Helix Interaktionen essentiell (siehe 2.2.2). Untersuchungen aus dieser Arbeitsgruppe (Schlereth et al., 2010a) mit Mutanten veränderter DNA Bindungskoopertivität zeigten, dass p53-vermittelte Apoptose starke H1-Helix Interaktionen erfordert, während für Zellzyklusarrest auch schwache Interaktionen ausreichend sind. Fällt die Interaktion an der H1-Helix jedoch ganz weg, ist p53 beinahe transkriptionell inaktiv (EE-Mutante). So zeigten beispielsweise Zellzyklusprofile von mit verschiedenen p53-Adenoviren infizierten Saos-2 und H1299 Zellen, dass Mutanten niedriger Koopertivität (EE,RR, EL) allenfalls einen G1-Arrest induzieren konnten, während hoch-kooperative Mutanten (RE, EE+RR) Apoptose auslösten. In Genexpressionsprofilen mit der niedrig-kooperativen Mutante EL und seinem Gegenspieler RE konnten zwei Klassen von Genen unterschieden werden: Klasse 1 wurde hauptsächlich von EL aktiviert und umfasste Gene für Zellzyklusarrest wie p21^{CDKN1A} und Mdm2, während Klasse zwei selektiv von RE aktiviert wurde und proapoptotische Gene wie Noxa und Casp1 umfasste.

Auch andere, teils frühere Untersuchungen konnten anhand bestimmter Merkmale zwei Klassen von p53 Zielgenen unterscheiden. So konnte gezeigt werden, dass p53 mit höherer Affinität an Zellzyklusarrest als an pro-apoptotische Gene bindet (Weinberg et al., 2005). Dafür scheint das zentrale CWWG-Motiv in den p53 RE entscheidend zu sein: Damit p53 binden kann, muss – im vorherrschenden Modell – die DNA gebogen werden; und die Flexibilität der DNA ist hoch, wenn das zentrale Motiv CATG lautet, während andere mögliche Sequenzen deutlich unflexibler sind (Balagurumoorthy et al., 2002; Balagurumoorthy et al., 1995). RE, die nur aus einer *half-site* bestehen, ein nicht-CATG Motiv und Spacer-Insertionen aufweisen, könnten also weniger perfekte p53 Bindungsstellen mit niedriger Affinität darstellen, für deren Bindung hohe Koopertivität der p53-Moleküle notwendig ist (Beno et al., 2011; Jordan et al., 2008; Riley et al., 2008; Schlereth et al., 2010a; Weinberg et al., 2005). **Tab. 1** fasst die Charakteristika der zwei Zielgenklassen zusammen.

Tab. 1: Charakteristika der p53 RE der zwei Klassen von p53-Zielgenen.

	Klasse 1	Klasse 2
Funktion	Zellzykluskontrolle	Apoptose
Beispiel	p21 ^{CDKN1A}	Noxa
Zentrales CWWG-Motiv	CATG	CAAG, CTTG, CTAG
Full-site/half-site	Full-Site	Half-site
Spacer	Nein	Ja
p53-Bindungsaffinität	Hoch	Niedrig
Kooperative Bindung notwendig	Nein	Ja

ChIP-seq Analysen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass hohe Kooperativität das Zielgenspektrum von p53 deutlich erhöht. So fanden sich 1667 Bindungsstellen für niedrig-kooperatives p53, wobei von diesen lediglich 88 von der transkriptionell beinahe inaktiven Mutante EE besetzt wurden. Im Gegensatz dazu fanden sich 3520 Bindungsstellen für hoch-kooperatives p53, wobei von diesen 375 ausschließlich von der über-physiologisch kooperativen Kombination aus EE und RR besetzt wurden (**Abb. 2-8**). Untersuchungen der Eigenschaften dieser Bindungsstellen bestätigten die in Tab.1 genannten Charakteristika und dass für die Bindung an die nicht-kanonischen p53 Bindungsstellen Kooperativität essentiell ist (Schlereth et al., 2013).

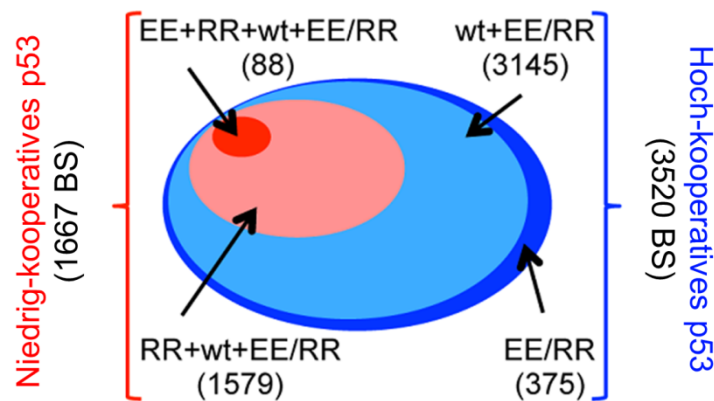


Abb. 2-8: Kooperativität erweitert das Zielgenspektrum von p53. p53-Bindungsstellen wurden in Saos-2-Zellen per ChIP-seq identifiziert und nach für die Bindung notwendiger Kooperativität klassifiziert. BS=Bindungsstelle (aus Schlereth et al., 2013)

Neben dieser zeigten auch noch andere Studien, dass ein „Standard-Repertoire“ – Zellzyklusarrest und Reperaturgene – als Antwort auf Stressstimuli immer aktiviert wird (Kracikova et al., 2013; Nikulenkov et al., 2012). Im Gegensatz dazu erfordert die Auslösung von Apoptose eine Bindung an die nicht-kanonischen RE und kann so vielschichtig reguliert werden. Dies erfolgt z.B. durch einige der oben genannten PTM oder auch durch die ASSP-Familie, welche die Affinität zu diesen RE erhöhen. Unklar ist, ob

diese erhöhte Affinität durch die Modifikation der Bindungskoopertivität selber bedingt wird, jedoch gibt es indirekte Hinweise darauf: ASPP2 konnte zwar die Rate an p53-vermittelter Apoptose durch niedrig-kooperatives p53 bis hin zum Wildtyp steigern, die Apoptose-Rate von hoch-kooperativem p53RE jedoch nicht mehr. Dies könnte darauf hindeuten, dass der apoptosefördernde Effekt von ASPP2 in der Steigerung der Kooperativität des Wildtyps in vivo besteht (Schlereth et al., 2010a).

2.2.6 Die Rolle der p53 DNA Bindungskoopertivität für die Tumorsuppression

Studien dieser Arbeitsgruppe mit p53^{RR/RR} Mäusen (Timofeev et al., 2013), welche homozygot für ein p53 mit reduzierter Kooperativität sind, zeigten die Relevanz der kooperativen DNA Bindung für die Tumorsuppression in vivo. Die Mäuse zeigten im Vergleich zum p53 Wildtyp eine erhöhte Rate an spontanen Tumoren und eine signifikant verringerte Überlebensdauer. Während die apoptotische Funktion von p53 durch die verminderte Kooperativität komplett verloren ging, war die Mutante in diesem Kontext noch in der Lage Zellzykluskontrolle, Seneszenz sowie metabolische und antioxidative Funktionen auszuüben. Im Vergleich zu p53-null Mäusen zeigten sich eine erhöhte Lebensdauer und eine deutlich niedrigere Rate an frühen T-Zell-Lymphomen, die 90 % der p53-null Mäuse entwickelten. Diese residuale Tumorsuppressoraktivität lässt sich auf die genannten Restfunktionen von p53RR zurückführen, welche jedoch nicht ausreichten, um onkogen-induzierte Tumoren zu unterdrücken.

Weitere Hinweise auf die Relevanz der kooperativen Bindung von p53 an die DNA für die Tumorsuppression in vivo geben Patientinnen und Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom, welche Keimbahnmutationen für p53 tragen und eine erhöhte Suszeptibilität für Krebs aufweisen. Unter diesen finden sich auch kooperativitätslimitierende Mutationen an der H1-Helix, für die experimentell ebenfalls ein selektiver Apoptosedefekt nachgewiesen werden konnte. Die damit verbundene erhöhte Krebsinzidenz zeigt, dass dieser Defekt die Tumorsuppressorfunktion von p53 vermindert (Schlereth et al., 2010a; Zeitlinger, 2013).

Weiterhin zeigte eine Analyse der Genexpressionsprofile von Brustkrebspatientinnen und der damit verbundenen Überlebenswahrscheinlichkeit, dass die verstärkte Expression von Genen, deren Transaktivierung durch p53 hohe Kooperativität erfordert, mit einem besseren Überleben einhergeht. Dies ließ sich jedoch nicht für „niedrig-kooperative“ Gene nachweisen, was weiterhin die Wichtigkeit kooperativer Bindung für die Tumorsuppression unterstreicht (Schlereth et al., 2013).

2.2.7 Tumorsuppression durch p53 – welche Programme sind wichtig?

p53 induziert also als Antwort auf Stress vielfältige Programme, deren Auslösung zudem vielschichtig reguliert ist. Für diese Regulierung spielt auch die Bindungskoopertivität eine Rolle, und p53 Mutanten mit verminderter Kooperativität und

selektivem Apoptosedefekt zeigen eine reduzierte Tumorsuppressoraktivität. Andere Studien zeigen jedoch auch zunächst widersprüchlich erscheinende Ergebnisse. In einer dieser Studien wurden Mutationen an drei Acetylierungsstellen in der p53 DBD eingeführt und damit die p53^{3KR/3KR} Knock-In Maus generiert, welcher die Fähigkeit zu p53-vermittelter Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz fehlt. Trotzdem wiesen diese Mäuse keine erhöhte Rate an frühen Tumoren auf, was von den Autoren auf die residualen p53-vermittelte antioxidativen und metabolischen Funktionen zurückgeführt wurde (Li et al., 2012). In einer weiteren Studie wurden Puma^{-/-} Noxa^{-/-} p21^{-/-} Triple Knock-out Mäuse generiert, denen damit drei der wichtigsten Effektoren p53-vermittelter Apoptose und Zellzyklusarrest fehlen. Auch in Abwesenheit dieser Proteine konnte p53 effektiv tumorsuppressive Funktionen ausüben (Valente et al., 2013). Eine in der p53 TAD eingeführte Mutation, welche p53 der Fähigkeit zur Transaktivierung fast aller klassischen p53 Zielgene beraubt, konnte ebenfalls Tumorstilstand in verschiedenen Mausmodellen verhindern, vermutlich über die erhaltene Fähigkeit zur Induktion von Seneszenz (Brady et al., 2011; Jiang et al., 2011).

Vermehrte Evidenz durch diese und viele weitere Studien deutet daher darauf hin, dass die verschiedenen Programme und ihr Beitrag zur Tumorsuppression im jeweiligen Zell- und Gewebekontext betrachtet werden müssen (Biegging et al., 2014; Mellert und Espinosa, 2013). Die oben genannten Studien deuten darauf hin, dass die antioxidativen und metabolischen Funktionen von p53 äußerst wichtig für die Tumorsuppression sind. Die Beigabe des Antioxidans N-Acetylcystein in der Nahrung von p53-null Mäusen konnte die Rate der sonst vorherrschenden T-Zell Lymphome verringern (Sablina et al., 2005), was diese Theorie unterstützt. Zellen sind physiologischerweise chronisch milden Stressoren ausgesetzt, auf die p53 vermutlich mit seinen antioxidativen und DNA-Reparaturprogrammen reagiert, anstatt Apoptose und Seneszenz auszulösen (Gottlieb und Vousden, 2010; Vousden und Lane, 2007). Kommt es allerdings durch Mutationen zur Onkogen-getriebenen Tumorigenese, ist die Auslösung von p53-vermittelter Apoptose und Seneszenz essenziell für die Tumorsuppression (Christophorou et al., 2006; Efeyan et al., 2006; Timofeev et al., 2013). Da Menschen vielen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind und eine sehr lange Lebensspanne haben, dürfte die durch Onkogene ausgelöste Transformation deutlich häufiger sein als bei Labormäusen (Mellert und Espinosa, 2013).

Auch in einem anderen Kontext bleiben Apoptose und Seneszenz von überragender Bedeutung: Als Antwort auf chemotherapeutische Behandlung. Insofern ist das Verständnis der Regulation von Zellschicksalsentscheidungen durch p53 – beispielsweise über die DNA Bindungskoooperativität – und der daraus folgende Einfluss auf eine Behandlung von großer Bedeutung.

2.3 Genomeditierung mit maßgeschneiderten Endonukleasen

Um die Funktion eines Gens bzw. seines zugehörigen Genproduktes zu untersuchen, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen Überexpressionsstudien, bei denen das zu untersuchende Gen – meist unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors – in das Genom eingebracht wird und die daraus folgenden Effekte beobachtet werden. Zum anderen Knock-Down Studien, bei denen das zu untersuchende Gen etwa über RNA-Interferenz „stillgelegt“ wird. Das Problem besonders der ersten Methode ist, dass das zu untersuchende Gen ungezielt in das Genom eingebracht wird. Dadurch ist zum einen nicht klar ist, wie viele Kopien in das Genom integrieren und zum anderen nicht an welchen Stellen, ob also beobachtete Effekte eventuell auch auf den Genloкус zurückzuführen sind (McMahon et al., 2012).

Das gezielte Verändern des Genoms in Säugetierzellen stellt daher eine interessante Möglichkeit für funktionale Studien von biologischen Prozessen dar und ist bereits seit langem Gegenstand der Forschung. *Homologous gene targeting* bezeichnet das Verändern einer bestimmten DNA-Sequenz durch homologe Rekombination mit einer in die Zelle eingebrachten Matrize, welche die gewünschte neue Sequenz umgeben von zur Zielregion homologen Abschnitte enthält (Capecchi, 1989) und wurde in Säugetierzellen Ende der 80er Jahre die ersten Male erfolgreich angewendet (Doetschman et al., 1987; Smithies et al., 1985). Diese Methode war jedoch sehr ineffizient, weil spontane homologe Rekombination nur äußerst selten vorkommt. Einen großen Fortschritt stellte daher die Entdeckung sequenzspezifischer Endonukleasen wie *I-SceI* dar (Jacquier und Dujon, 1985), welche Erkennungssequenzen >12 bp haben und daher an genau einer Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch (DSB) induzieren. Dieser DSB erhöht die Frequenz homologer Rekombination (HR) um das über 1000fache (Jasin, 1996). Neben HR läuft in einer Zelle nach Erkennen eines DSB aber weitaus häufiger ein anderer Reparaturmechanismus ab, das *nonhomologous end-joining* (NHEJ). Hier werden die beiden offenen Enden direkt miteinander ligiert, was ein schneller und effizienter, jedoch hoch-mutagener Prozess ist (Mao et al., 2008; Moore und Haber, 1996; van den Bosch et al., 2002). Mit der Entwicklung maßgeschneiderter Endonukleasen entsteht so die Möglichkeit, durch einen induzierten DSB an einer gewünschten Stelle im Genom die zellulären Reparaturmechanismen auszunutzen: Durch NHEJ kommt es zur zielgerichteten Mutagenese und so beispielsweise zur Ausschaltung eines Gens; durch gleichzeitige Transfektion eines Matritzenplasmids mit homologen Bereichen kann HR getriggert werden und so beliebige DNA-Sequenzen zielgerichtet inseriert werden.

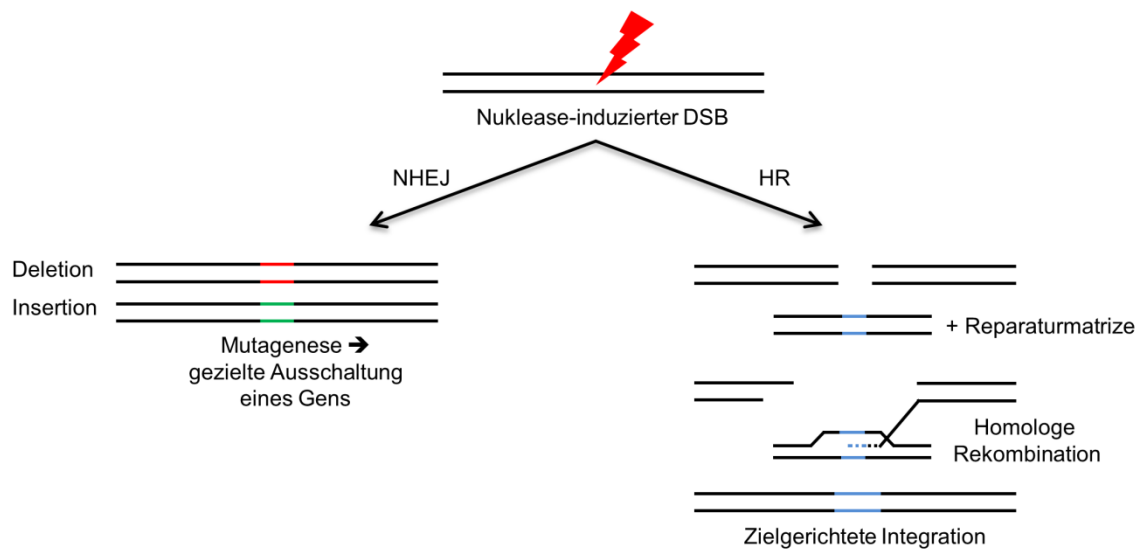


Abb. 2-9: Genomeditierung durch Nuklease-induzierte Doppelstrangbrüche (DSB). Mittels einer sequenzspezifischen Nuklease kann an einer bestimmten Stelle im Genom ein Doppelstrangbruch eingeführt werden. Daraufhin können zwei zelluläre Reparaturprogramme ablaufen: *Nonhomologous end-joining* (NHEJ) führt über Deletionen oder kleine Insertionen zur Mutagenese und kann genutzt werden, ein Gen gezielt auszuschalten. Durch Zugabe einer Reparaturmatrize mit einem gewünschten DNA-Konstrukt (blau) flankiert von zur Zielregion homologen Bereichen (schwarz) kann homologe Rekombination getriggert und so DNA zielgerichtet integriert werden (gezeichnet nach Sander und Joung, 2014)

2.3.1 Übersicht über Endonukleasen zur Genomeditierung

Meganukleasen

Diese natürlich vorkommenden Enzyme sind ursprünglich mobile genetische Elemente, die im Wirtsgenom in Introns codiert werden und sich durch Induktion eines Doppelstrangbruches im verwandten Allel verbreiten (Chevalier und Stoddard, 2001; Grizot et al., 2009). Dieser DSB triggert dann eine Reparatur durch HR und die Insertion der für das Enzym codierenden Sequenz (Jacquier und Dujon, 1985). Meganukleasen sind durch ihre sehr lange Erkennungssequenz von 14-40 bp hoch-spezifisch und weisen dadurch gleichzeitig eine sehr geringe Toxizität auf (Chevalier und Stoddard, 2001), weswegen sie sich sehr gut zur Genomeditierung eignen. Der am besten erforschteste Vertreter dieser Gruppe ist *I-SceI* (s.o) und ebnete den Weg für zahlreiche *gene targeting*-Studien, in denen erstmals hohe Raten an zielgerichteter Integration auch in immortalisierten Säugetierzellen erreicht werden konnten (Choulifa et al., 1995; Rouet et al., 1994). Zwar konnten mittlerweile über 250 natürliche Meganukleasen entdeckt werden (Chevalier und Stoddard, 2001), jedoch ist es für gezielte Editierung notwendig, maßgeschneiderte Nukleasen zu entwickeln und anzuwenden. Da Nukleaseaktivität und DNA-Erkennung von derselben Domäne vermittelt werden, ist dies jedoch technisch anspruchsvoll (Pâques und Duchateau, 2007; Silva et al., 2011). Kenntnisse der Struktur der am besten erforschten Untergruppe, der LAGLIDADG Familie, ermöglichten dennoch die

Konstruktion künstlicher Meganukleasen (Arnould et al., 2006; Rosen et al., 2006; Seligman et al., 2002; Smith et al., 2006).

Die Meganuklease *I-SceI* gilt wegen ihrer sehr hohen Spezifität, der damit verbundenen kaum vorhandenen Toxizität (keine *off-target* Effekte) und der erreichten Raten an zielgerichteter Integration von bis zu 10 % als „Goldstandard“ der Genomeditierung (Pâques und Duchateau, 2007; Silva et al., 2011). Eine künstlich konstruierte Variante von *I-CreI*, die eine 24 bp lange Erkennungssequenz im humanen Rag1 Gen aufweist, zeigte bei ähnlich niedriger Zytotoxizität eine Rate an zielgerichteter Integration von bis zu 6 % (Arnould et al., 2011; Grizot et al., 2009).

Zink-Finger Nukleasen (ZFN)

Die Nukleasedomäne des Restriktionsenzym FokI und eine aus Zink-Finger Proteinen abgewandelten DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche wiederum aus drei bis sechs Zinkfingerdomänen zusammengesetzt ist, bilden diese sequenzspezifische Nuklease. Jede Einzeldomäne bindet ein Trinukleotid; zwei solcher ZFN binden dann als Heterodimer an die DNA und induzieren die Spaltung an der gewünschten Stelle (Kim et al., 1996). Geringere Spezifität und damit einhergehende Toxizität stellt ein Hauptproblem der ZFN dar. Im Vergleich mit *I-SceI* zeigt sich daher eine höhere Zytotoxizität (Mussolino et al., 2011; Zhang et al., 2014).

Transcription activator–like effector nucleases

Transcription activator–like effector nucleases (TALENs) nutzen ebenfalls die Nukleasedomäne von FokI, allerdings an die DBD von TAL-Effektor Proteinen aus dem Protobakterium *Xbantomonas* gebunden (Boch, 2011; Joung und Sander, 2013). Diese DBD besteht aus hoch konservierten Tandem-Repeats, welche sich jeweils nur in zwei hochvariablen Aminosäuren unterscheiden. Jedes Repeat bindet ein Basenpaar an der DNA und die beiden variablen Aminosäuren bestimmen welche dies ist (Boch et al., 2009; Moscou und Bogdanove, 2009). So können sehr leicht TALENs mit einer individuellen DNA-Erkennungssequenz generiert werden (Morbitzer et al., 2010). Durch den modularen Aufbau und der damit großen möglichen Erkennungssequenzen zeigen sich wenige DSB an unerwünschten Stellen und eine geringe Toxizität, auch wenn *off-target* Effekte trotzdem vorkommen (Mussolino et al., 2011; Zhang et al., 2014).

CRISPR/Cas-System

Dieses System basiert auf einem Abwehrmechanismus für Fremd-DNA bekannt aus Bakterien, CRISPR (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat) (Übersicht in Sander und Joung, 2014). Erster Bestandteil des Systems ist CRISPR-RNA (crRNA), welche zu einem Teil aus konservierten CRISPR-Repeats und zu einem anderen Teil aus

einer sogenannten *Protospacer*-Sequenz besteht. Letztere ist dabei komplementär zu der Ziel-DNA-Sequenz, die geschnitten werden soll. Nächster Bestandteil ist tracrRNA (transactivating CRISPR RNA), welche komplementär zu dem CRISPR-Repeat ist. Sie ist notwendig, um den dritten Bestandteil des Systems, die Cas9-Nuklease (CRISPR-associated 9) zu binden; crRNA und tracrRNA bilden dabei zusammen die gRNA (guiding RNA). Durch die *Protospacer*-Sequenz in der gRNA wird die Nuklease zur Zielsequenz geleitet und induziert dort einen DSB. Vorteil ist der einfache Aufbau und die damit enorme Variabilität der Zielsequenz. Allerdings treten auch hier noch Limitationen in Form von *off-target* Effekten und von hohen Raten an NHEJ, die neben HR ablaufen, auf.

2.3.2 Auswahl einer geeigneten Nuklease

Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Möglichkeit, durch Endonuklease-vermittelte zielgerichtete Integration von DNA-Konstrukten isogene Zelllinien zu generieren. Jede dieser Zelllinien hat dann theoretisch das zu untersuchende Gen oder seine Varianten nur einmal im Genom integriert und dies am gleichen Genlokus unter der Kontrolle der gleichen regulatorischen Elemente. Dies ermöglicht es, auch kleine Effekte herauszuarbeiten und so eine optimale Vergleichbarkeit der Zelllinien untereinander – und damit des zu untersuchenden Gens und seiner Produkte – herzustellen (DeKolver et al., 2010; McMahon et al., 2012; Soldner et al., 2011).

Da der Ort der Integration für diesen Ansatz nicht das entscheidende Kriterium ist, wurde entschieden, eine das humane Rag1 Gen schneidende Meganuclease zur Generierung isogener Zelllinien zu verwenden (siehe auch 4.1.11). Die hohe Spezifität bei geringer Toxizität im Vergleich zu den anderen Systemen war dabei besonders wichtig. Das CRISPR/Cas-System war zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht publiziert.

2.4 Problemstellung und Ziele dieser Arbeit

Vielfältige Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die p53 DNA Bindungskoooperativität essentiell für die Selektion von pro-apoptotischen Zielgenen ist sowie maßgeblich zur tumorsuppressiven Funktion von p53 beiträgt (Schlereth et al., 2010a; Schlereth et al., 2013; Timofeev et al., 2013; Zeitlinger, 2013).

Der Einfluss der Bindungskoooperativität auf das langfristige Proliferationsverhalten von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* konnte dabei bislang noch nicht vergleichend untersucht werden. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Modell zu etablieren, welches das ganze Spektrum der Kooperativität und der damit verbundenen Auswirkungen auf das Zellschicksal abdeckt und untersuchbar macht. Der Einfluss von

chemotherapeutischer und/oder p53-modulierender Substanzen auf das Zellschicksal in Abhängigkeit der Kooperativität sollte dabei ebenfalls untersuchbar sein.

Vorherige Versuche der Etablierung eines solchen Zellkulturmodells mit dem ganzen Spektrum an Kooperativitätsmutanten in p53^{-/-} Zelllinien wiesen zwei Probleme auf: Zum einen zeigte sich sofort nach Restitution der Zellen mit p53 eine starke, p53-vermittelte Reaktion (je nach H1-Helix Mutation z.B. massive Apoptose). Zum anderen verloren die Zellen die Expression der als viraler Vektor restituierten p53-Konstrukte. Ein daraus abgeleitetes, spezifischeres Ziel dieser Arbeit war daher, ein p53-Expressionssystem zu generieren, was a) induzierbar und b) überwachbar sein sollte.

Es konnten bisher noch keine Untersuchungen des Einflusses der Bindungskooperativität auf das Zellschicksal mithilfe isogener, d.h. für die Expression von p53 identischer Zelllinien durchgeführt werden. Die p53 Proteinlevel selber haben allerdings auch einen Einfluss auf das Zellschicksal (siehe 2.2.4.2). Daher sollten mögliche Einflüsse unterschiedlich starker Expression für optimale Vergleichbarkeit der H1-Helix Mutanten ausgeschlossen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, die zielgerichtete Integration von DNA-Konstrukten durch Meganuclease-induzierte homologe Rekombination im Rag1 Gen in der Arbeitsgruppe zu etablieren und so isogene Zelllinien für die Untersuchung der Bindungskooperativität zu generieren.

3 Material

3.1 Organismen

3.1.1 Bakterienstämme

Name	Genotyp
E.Coli TOP10F⁺	F'[lacIq Tn10(tetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 λ-
E.Coli DH10B	F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-
E.Coli TOP10 ccdB Survival	F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2

3.1.2 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
H1299	Humane Zelllinie aus einer Lymphknotenmetastase eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, in der AG Stiewe vorhanden	(Phelps et al., 1996)
293T	Humane embryonale Nierenzellen mit Ad5-E1A und SV40 Large T-AG transformierte Zellen	(Graham et al., 1977)

3.2 Plasmide

Bezeichnung	Insert	Herkunft
pCMVneo-p53WT	p53-WT	In der AG Stiewe vorhanden
pCMVneo-p53EE	p53-R181E [EE]	In der AG Stiewe vorhanden
pCMVneo-p53RR	p53-E180R [RR]	In der AG Stiewe vorhanden
pCMVneo-p53EL	p53-R181L [EL]	In der AG Stiewe vorhanden
pCMVneo-p53RE	p53-E180R-R181E [RE]	In der AG Stiewe vorhanden
pBabe-puro-p53EE-ER ^{TAM}	p53EE-ER ^{TAM}	In der AG Stiewe vorhanden
pCMV-GLuc	GLuc	Targeting Systems
pENTR4-T2A	T2A-Sequenz	In der AG Stiewe vorhanden
pENTR4-T2A-GLuc	GLuc	Im R. d. A. hergestellt*
pENTR4-ER ^{TAM} -T2A	ER ^{TAM}	Im R. d. A. hergestellt
pENTR4-ER ^{TAM} -T2A-GLuc	ER ^{TAM}	Im R. d. A. hergestellt
pENTR4-p53EE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53-EE	Im R. d. A. hergestellt
pENTR4-p53RR.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53-RR	Im R. d. A. hergestellt
pENTR4-p53EL.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53-EL	Im R. d. A. hergestellt
pENTR4-p53WT.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53-WT	Im R. d. A. hergestellt

pENTR4-p53RE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53-RE	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo		Collectis Bioreserach
pIM.Rag1.CMV.Neo-attRfB	Gateway®-RfB	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo-T2A-GLuc	T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo-p53EE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53EE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo-p53RR.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53RR.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo-p53EL.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53EL.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo-p53WT.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53WT.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pIM.Rag1.CMV.Neo-p53RE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53RE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pCMVneo-Bam-attRfA	attRfA	In der AG Stiewe vorhanden
pCMVneo-ER ^{TAM} -T2A-GLuc	ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pCMVneo-p53EE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53EE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pCMVneo-p53RR.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53RR.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pCMVneo-p53EL.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53EL.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pCMVneo-p53WT.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53WT.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
pCMVneo-p53RE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	p53RE.ER ^{TAM} -T2A-GLuc	Im R. d. A. hergestellt
p53AIP1-Luc		In der AG Stiewe vorhanden
p53cons-Luc		In der AG Stiewe vorhanden
pCMV-GFPS	GFP-Spektrin	In der AG Stiewe vorhanden
pCR 2.1 TOPO®		Life Technologies
pCR BluntII TOPO®		Life Technologies
pCLucIPZ-nsh	CLuc	In der AG Stiewe vorhanden

* Im R. d. A. hergestellt = Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

3.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' → 3'
M13_for	Sequenzierung	gtaaaacgacggccag
M13_rev	Sequenzierung	caggaacagctatgac
ER_seq_rev	Sequenzierung	ggcagccctcatgtctcc
p53EE_attL1_for	Sequenzierung	cttaagctcgggcccacaataatg
ER-R	Sequenzierung	gcacacaaactcttcaccctgc
p53seq-cDNA-for	Sequenzierung	ggccaagacctgccctgtgc
p53seq-cDNA-rev	Sequenzierung	gccaaacctcaggcggctcat
pENTR-NotI-Gluc_S	Klonierung	gcggccgcaatgggagtc aaagtctg
pENTR-NotI-Gluc_AS	Klonierung	gggtctagattagtcaccaccggcccc

ERT ^{TAM} -KpnI-S	Klonierung	cgtgggtaccctctatgac
ERT ^{TAM} -EcoRI-AS	Klonierung	gggaattcgatcgtgttggggaagccctctgc
p53-BamHI-for	Klonierung	ccgggatccatggaggagccgcagtcagat
hp53_ohneSTOP_BamHI_rev	Klonierung	gtggatccccgtctgagtcaggc
Rag1_for	PCR	ggaggattgggaagacaatagc
Rag1_rev	PCR	ctttcacagtctgtacatcttgt
cGPS_control_Rag1_for	PCR	gggaaagggtcttggcctgc
cGPS_control_Rag1_rev	PCR	agcctcgtgcctctcctcgg
RTGAPDH_for	q-PCR	aatggaaatcccatcaccatct
RTGAPDH_rev	q-PCR	cgccccacttgattttgg
RTp21_for	q-PCR	tggagactctcagggtcgaaa
RTp21_rev	q-PCR	ccggcgtttggagtggta
Mdm2_for	q-PCR	gggacgccatcgaatcc
Mdm2_rev	q-PCR	atccaaccaatcacctgaatgtt
qRT-NOXA-for	q-PCR	cacgaggaacaagtgcaggt
qRT-NOXA-rev	q-PCR	cagtcagggttcctgagcaga

3.4 Lösungen, Puffer und Medien

Allgemeine Lösungen

LB-Medium

5 g/l NaCl
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l Baktotrypton
 pH 7,5

LB-Agar

1,5 % Agar-Agar in LB-Medium

50 x TAE

2 M Tris-Acetat
 50 mM EDTA, pH 8,0

PBND-Puffer

50 mM	KCl
10 mM	Tris-Cl, pH 8.3
2,5 mM	MgCl ₂ -6H ₂ O
0,45% (v/v)	Nonidet P40
0,45% (v/v)	Tween 20
ddH ₂ O	

Antibiotika

Ampicillin	100 mg/ml
Kanamycin	50 mg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml

Puffer für DNA-Präparation im Mini-Maßstab**Puffer P 1**

50 mM	Tris HCl, pH 8,0
10 mM	EDTA, pH 8,0
100 µg/ml	RNase A

Puffer P 2

200 mM	NaOH
1 % (w/v)	SDS

Puffer P 3

3 M	Kaliumacetat
pH 5,5 mit Essigsäure einstellen	

Lösungen für die Proteinbiochemie**RIPA-Lysepuffer**

150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,1 % (w/v)	SDS
1 % (v/v)	Triton X-100
1 % (v/v)	Natrium-Desoxycholat
1 mM	EGTA

Zusammensetzung Trenngel 10 %

2,5 ml	40 % Acrylamid-Mix
2,5 ml	1,5 M Tris-HCl-Lösung, pH 8,8
4,9 ml	ddH ₂ O
17 µl	30 % APS
6 µl	TEMED

Zusammensetzung Sammelgel 4 %

0,5 ml	40 % Acrylamid-Mix
1,25 ml	Tris-HCl-Lösung, pH 6,8
3,2 ml	ddH ₂ O
12,75 µl	30 % APS
8 µl	TEMED

5 x SDS-Laufpuffer

125 mM	Tris
1,25 mM	Glycin
0,5 % (w/v)	SDS

5 x Blotpuffer

970 mM	Glycin
125 mM	Tris-HCl, pH 8,3
15 %	Methanol

10 x TBS

1,5 M NaCl
500 mM Tris-HCl, pH 7,5

TBS-T 0,1

1 x TBS mit 0,1 (v/v) Tween

Coelenterazin Stocklösung

10mM Coelenterazin in angesäuertem 100% EtOH (p.a.)
(10 ml 100% EtOH + 200 µl 6M HCl)

Lösungen und Medien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Life Technologies
Amphotericin B solution 250 µg/ml	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologies
Fetales Kälberserum (FBS)	PAA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies
10x Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Lipofectamine 2000	Life Technologies
Geneticin (G418 Sulfat)	Life Technologies
4-Hydrotamoxifen	Sigma-Aldrich
Ganciclovir	Apotheke UKGM
Nutlin-3, InSolution, Racemic	Merck Millipore

3.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Fermentas, NEB
GoTaq DNA Polymerase	Promega
PfuUltra HotStart DNA Polymerase	Agilent
HotStar Taq Plus DNA Polymerase	Qiagen
RNase A	Applichem
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Life Technologies

3.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
α-β-Aktin (AC-15)	1:10000	Maus	Abcam (ab6276)
α-p53 (DO-1)	1:10000	Maus	Santa Cruz (sc-126)
α-ERα (HC-20)	1:200	Kaninchen	Santa Cruz (sc-543)
α-cPARP	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling (CS 9541)
α-p21 (C-19)	1:200	Kaninchen	Santa Cruz (sc-397)

Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
α -Mouse IgG (HRP)	1:5000	Schaf	GE Lifescience (NXA-931)
α -rabbit IgG (HRP)	1:5000	Esel	GE Lifescience (NA-934)

3.7 Käufliche Kits

BioLux Cypridina Luciferase Assay Kit	NEB
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit	BioVision
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega
cGPS [®] Custom Full Kit	Cellectis Bioresearch
Coelenterazine	PJK
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Gateway Vector Conversion System	Life Technologies
GeneRuler [™] DNA Ladder Mix	Fermentas
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	Fermentas
PeqGOLD Tissue DNA Mini Kit	Peqlab
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen
SuperScript [®] Vilo [™] cDNA Synthesis Kit	Life Technologies
SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate	Pierce
SYBR [®] Green JumpStart [™] Taq ReadyMix [™]	Sigma-Aldrich
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Life Technologies
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
ZeroBlunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Life Technologies

3.8 Größenmarker

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Sequenzen im Agarosegel wurde der GeneRuler[™] DNA Ladder Mix von ThermoFisher Scientific verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder von ThermoFisher Scientific verwendet.

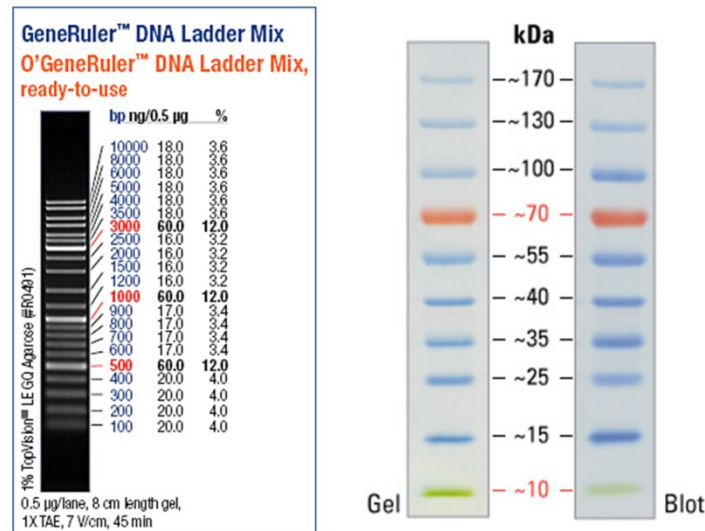


Abb. 3-1: Nukleinsäuremarker (links) und Proteinmarker (rechts)

3.9 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte

Alle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen: Amersham, Applichem, BD Pharmingen, BioRad, Fermentas, Greiner, Heraeus, Life Technologies, Macherey Nagel, New England Biolabs, PJK, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Sarstedt, Sigma, Stratagene, Thermo Scientific.

Die Hersteller der benutzten Laborgeräte waren, soweit nicht anders vermerkt: Affymetrix, Amersham, Applied Biosystems, BD Biosciences, Beckman Coulter, Bertold Detection Systems, Biometra, Bio-Rad, Eppendorf, Gilson, Heraeus, Infors, Intas, Invitrogen, LI-COR Biosciences, Mettler-Toledo, Millipore, MVE Cryosystems, Nalgene, Olympus, Peqlab, Qiagen, Schott, Scientific Industries, Severin, Siemens, Stratagene, Systec, Thermo Scientific, Vacuubrand, Zeiss

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Adhärenzte Zelllinien wurden in Zellkulturschalen in einem Inkubator bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ – Gehalt kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) verwendet, welches mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS), 1% (v/v) Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10mg/ml) und 0,4 % (v/v) Amphotericin B versetzt wurde. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit steril verpackten Einmalartikeln oder autoklavierten Materialien durchgeführt.

4.1.2 Passagieren, Einfrieren, Auftauen

Die verwendeten Zelllinien wachsen einschichtig als Monoschicht. Das Erreichen der maximal möglichen Dichte von Zellen an der Oberfläche einer Zellkulturschale bezeichnet man als Konfluenz. In diesem Falle wird das Wachstum durch Kontaktinhibition gehemmt, weshalb alle Zellen nach Möglichkeit bereits bei Erreichen von Subkonfluenz (ca. 80-90 %) passagiert wurden. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann eine je nach Größe der Kulturschale geeignete Menge Trypsin-EDTA zugegeben. Trypsin ist dabei eine Protease, die Zellwandproteine der Zellen abbaut, die für den Zell-Zell bzw. Zell-Oberflächen Kontakt wichtig sind, EDTA komplexiert Calcium- und Magnesium-Ionen, welche ebenfalls eine wichtige Rolle für diese Kontakte spielen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C bis sich alle Zellen gelöst hatten, dies wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Daraufhin wurden die Zellen in einer geeigneten Menge DMEM, mindestens das zehnfache des Volumens an Trypsin, zur Inaktivierung desselbigen, einige Male zur weiteren Vereinzelung resuspendiert und eine geeignete Menge der Zellsuspension auf einer neuen Zellkulturschale ausgesät. Diese wurde dann mit der entsprechenden Menge DMEM aufgefüllt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen auf einer 10 cm oder 15 cm Schale bei ca. 90-95% Konfluenz wie beschrieben abtrypsiniert, in 10 ml DMEM resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 4°C und 300g für fünf Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und jeweils ein ml in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden dann in einem speziellen Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren, wobei der Behälter durch einen Mantel aus 2-Propanol eine lineare Temperaturreduktion von

1°C/Minute gewährleistet. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen zunächst auf Eis überführt und dann bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Umgehend danach wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon mit 20 ml frischem DMEM überführt um das zytotoxische DMSO zu verdünnen, mehrmals invertiert und dann fünf Minuten bei 4°C, 300g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann wiederum in 10 ml frischem DMEM resuspendiert, auf einer neuen Zellkulturschale ausgesät und unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert.

4.1.3 Zellzahlbestimmung

Um exakte Zellzahlen für bestimmte Experimente aussäen zu können, war oft eine Bestimmung der Zellzahl in einer definierten Menge Zellsuspension nötig. Dafür wurden 10 µl einer Suspension in eine Neubauer improved – Zählkammer mit Deckgläschen pipettiert und die gesunden Zellen unter einem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden mindestens 200 Zellen gezählt und die Zellzahl dann wie folgt berechnet:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

4.1.4 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen (H1299)

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Dafür gibt es mehrere Verfahren, im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lipofektion mittels Lipofectamine 2000 (Life Technologies) verwendet.

Die Funktionsweise von Lipofectamine 2000 basiert auf den kationischen Lipiden in diesem Reagenz. Diese binden spontan das negativ geladene DNA-Rückgrat und bilden so DNA-Lipid-Komplexe, die positiv geladen sind und so mit der negativ geladenen Zellwand interagieren können. Dort werden sie vermutlich über Endocytose aufgenommen (Liu, 2003).

Am Vortag eines Versuches wurden Zellen so ausgesät, dass sie am Folgetag ca. 90% konfluent waren, je nach Versuch in unterschiedlichen Formaten. Vor der Transfektion wurde das Medium in den Zellkulturschalen auf Antibiotika-freies DMEM gewechselt. Für die Transfektion wurden zunächst Plasmid-DNA (0,2 µg) und Lipofectamine 2000 (0,5 µl) in separaten Reagiergefäßen jeweils in 25 µl DMEM ohne Zusätze gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden beide Mischungen vereinigt und nochmals für 25 Minuten zur Komplexbildung inkubiert. Die Angaben gelten für Transfektionen im 96-well Format. Für andere Formate wurden die Mengen entsprechend skaliert. Nach 6 Stunden wurde das Transfektionsmedium wieder auf DMEM mit allen Zusätzen gewechselt.

4.1.5 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen (H1299)

Zur Herstellung von Zelllinien, die eingebrachte DNA dauerhaft, also stabil ins Genom integrieren, wurden Vektoren mit einem Antibiotikaresistenzgen verwendet. Das Protokoll war das gleiche wie bei einer transienten Transfektion, jedoch wurden die Zellen 48 Stunden später passagiert und in DMEM mit einem Selektionsantibiotikum, hier mit dem Aminoglykosid Geneticin (Life Technologies, G418) (800 µg/ml) kultiviert. Nur Zellen, welche das Plasmid und damit auch das ebenfalls auf dem Plasmid vorhandene Neomycin (Geneticin)-Resistenzgen integriert haben, können überleben. Das Gen codiert für die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase, welche Aminoglykoside wie Geneticin (G418), Neomycin, Kanamycin etc. phosphoryliert und damit unwirksam macht (Hadfield et al., 1990). Für Zellen ohne Resistenzgen ist G418 zytotoxisch, da es die 80S – Untereinheit der Ribosomen und damit die Proteinbiosynthese inhibiert.

4.1.6 Isolation von Einzelzellklonen

Um monoklonale Zelllinien zu generieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wurden 48-72 Stunden nach der Transfektion mit dem gewünschten Plasmid Zellen passagiert, sehr dünn (3000-9000 Zellen/15cm Schale) ausgesät und in Gegenwart von Geneticin kultiviert. Nach ca. zwei Wochen waren einzelne Zellkolonien gewachsen, die unter einem Lichtmikroskop mit einer 200 µl Pipette gelöst, in Medium aufgenommen und dann in einer 48- oder 96-well Platte kultiviert wurden.

Zum anderen wurden die Zellen sieben Tage lang in einer 10 cm Schale selektiert, und danach mit der *limiting dilution* Methode in eine 96-well Platte ausgesät. Dabei wurde eine Zellsuspension so verdünnt, dass rechnerisch nur noch 1-2 Zellen pro well vorhanden waren. Nach zwei Wochen waren die Zellen in den einzelnen Vertiefungen so dicht gewachsen, dass sie weiter passagiert werden konnten.

4.1.7 Herstellung stabiler Zelllinien durch lentivirale Transduktion

Für die Herstellung einer stabilen Zelllinie wurde bereits hergestellter Virus aus der Arbeitsgruppe übernommen. Einen Tag vor der Infektion wurden die Zellen dünn in einer 6-well-Platte ausgesät ($2,5 \times 10^4$ Zellen/well). Am Tag der Transduktion wurde frisches Polybrene-haltiges (8 µg/ml) Medium und eine entsprechende Menge Virus zugegeben. Anschließend erfolgte eine Spin-Infektion, bei der die Zellen eine Stunde bei 37°C, 1500rpm zentrifugiert wurden. 4 Stunden später erfolgte ein Medienwechsel, 24 Stunden später wurde die Selektion mithilfe von Puromycin (1 µg/ml) begonnen.

4.1.8 Zellviabilitätsassay

Um die Zellviabilität von gesunden im Vergleich zu mit bestimmten Substanzen behandelten Zellen zu quantifizieren, wurde der CellTiter-Glo® Assay (Promega) eingesetzt. Dies ist ein Lumineszenz-basierter Assay, der die Anzahl der lebenden Zellen anhand des Adenosintriphosphat-Gehalts (ATP) in einer Probe bestimmt. Eine rekombinante Luziferase, die im CellTiter Glo® Puffer enthalten ist, katalysiert unter ATP-Verbrauch eine photochemische Reaktion unter Freisetzung von Licht. Da die Zellzahl direkt proportional zum Lichtsignal ist (Petty et al., 1995), kann anhand dessen eine Aussage über die metabolisch aktiven (nur diese produzieren noch ATP) und damit gesunden Zellen in der Probe getroffen werden.

Die Durchführung erfolgte in weißen 96-well Platten mit durchsichtigem Boden, um die Behandlung und Messung im selben Kulturgefäß durchführen zu können. Nachdem Reagenz und Kulturgefäße 30 Minuten auf Raumtemperatur gelagert wurden, erfolgte mit einer Mehrkanalpipette die Zugabe des CellTiter Glo® Puffers direkt zum Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Platten für 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Zur Messung wurde das Luminometer Orion II (Berthold Detection Systems) eingesetzt, die Lichtmessung erfolgte für eine Sekunde.

4.1.9 Durchflusszytometrie

Diese Methode eignet sich, um Zellsuspensionen auf Einzelzellebene auf verschiedene Eigenschaften hin zu untersuchen. Grundprinzip ist hierbei, dass einzelne Zellen einen Laserstrahl passieren und dabei je nach Eigenschaft das Licht unterschiedlich streuen. Man unterscheidet das Vorwärtsstreulicht (FSC), welches als Maß für die Zellgröße herangezogen wird, sowie das Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Granularität einer Zelle; beide werden über jeweilige Linsen gesammelt und dann in elektrische Impulse umgewandelt. Des Weiteren wird durch vier Filter Licht unterschiedlicher Wellenlänge gemessen. So ist es möglich, durch Fluoreszenzfarbstoffe gefärbte Zellen zu erkennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen auf aktivierte Caspase-3, einem Schlüsselenzym im Signaltransduktionsweg der Apoptose, untersucht. Als Effektorcaspase führt ihre Aktivierung zur Spaltung zellulärer Proteine. Die Anzahl an Zellen mit aktivierter Caspase-3 korreliert daher mit der Anzahl an Zellen in Apoptose. Mittels des CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit (Biovision) wurden Zellen durch das Flourchrom FITC, welches selektiv an Caspase-3 bindenden Inhibitor DEVD-FMK gekoppelt ist, markiert. Zur Detektion von FITC im Accuri C6 Flow Cytometer (BD Bioscience) wurde der Filter FL1 angewandt. Mittels FSC/SSC wurde Zelldebris aus der Analyse ausgeschlossen.

4.1.10 Tamoxifen-induzierbares ER^{TAM}-System

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ER^{TAM}-Fusionsproteine verwendet, bei denen das zu untersuchende Protein an einen Östrogen-Rezeptor gekoppelt wurde. Dieser Rezeptor ist aufgrund einer Punktmutation (G525R) transkriptionell inaktiv, kann aber durch das synthetische 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) aktiviert werden (Littlewood et al. 1995). Im inaktiven Zustand verbleibt das Fusionsprotein im Zytoplasma, durch Zugabe von 4-OHT wird der Rezeptor aktiviert und in den Nucleus transloziert, wo das Protein seine biologische Funktion ausüben kann. Zur Aktivierung wurde eine Konzentration von 100 nM 4-OHT eingesetzt (Putzer et al., 2000).

4.1.11 Zielgerichtete Integration mit dem cellular Genome Positioning System (cGPS®)

4.1.11.1 Funktionsweise

Mithilfe dieses kommerziellen Systems soll es möglich sein, eine gewünschte DNA-Sequenz an einen bestimmten Genlokus, hier ins Rag1-Gen humaner Zelllinien, durch homologe Rekombination zielgerichtet zu integrieren. Das System besteht dabei aus zwei Hauptkomponenten: Zum einen der hsRag1-Meganuklease, einer künstlich designten sequenzspezifischen Endonuklease, welche eine 24 bp lange Sequenz im humanen Rag1-Gen (Rekombination-aktivierendes Gen 1) erkennt und an exakt dieser Erkennungssequenz einen Doppelstrangbruch induziert (Grizot et al., 2009). Zum anderen der hsRag1 Integrationsmatrix, einem Plasmid, in welchem eine Expressionskassette von zwei zum Rag1-Gen homologen DNA-Abschnitten flankiert ist. Wenn es in der Zelle zu einem Doppelstrangbruch (DSB) kommt, gibt es prinzipiell zwei Reparaturmöglichkeiten: Nicht-homologes End-joining (NHEJ), bei dem die beiden Enden direkt miteinander ligiert werden, sowie die Reparatur durch homologe Rekombination (HR) (van den Bosch et al., 2002). Für letztere dienen die beiden homologen Bereiche im Integrationsplasmid als Matrize; durch das gezielte Setzen von DSB (durch die hsRag1-Meganuklease) und dem gleichzeitigen Einschleusen einer Reparaturmatrix soll die Frequenz der sonst selteneren HR deutlich erhöht werden (Pâques und Duchateau, 2007). In der Expressionskassette liegt erstens ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und zweitens eine *Multiple Cloning Site*, in die die gewünschten Gene hinter einen weiteren CMV-Promotor kloniert werden können. Downstream der homologen Regionen liegt ein für die Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-Tk) kodierendes Gen (Abb. 4-1). Das Genprodukt phosphoryliert das für humane Zellen untoxische *Prodrug* Ganciclovir (GCV) in Ganciclovir-Triphosphat, welches in die DNA sich teilender Zellen inkorporiert wird und letztendlich zum Zelltod führt (Barese et al., 2012).

Nach gleichzeitiger Transfektion der beiden Plasmide wurde zunächst mit G418 auf das Neomycin-Resistenzgen selektioniert, d.h. nur Zellen die die Integrationsmatrix integriert haben, konnten überleben. In einem zweiten Schritt wurde eine Gegenselektion mit Ganciclovir durchgeführt. Zellen, die das gewünschte Gen ausschließlich durch homologe Rekombination ins Genom integriert haben, exprimieren nicht das HSV-Tk Genprodukt, da es im Integrationsmatrix Plasmid außerhalb der homologen Regionen liegt (**Abb. 4-1a**) und überleben somit die Selektion. In allen anderen Zellen wandelt die HSV-Tk Ganciclovir in das toxische GCV-Triphosphat um und führt somit zum Absterben der Zellen. In der Theorie sollten so nach Abschluss der Selektion nur Klone überlebt haben, die genau eine Kopie des gewünschten Gens im Rag1-Lokus tragen.

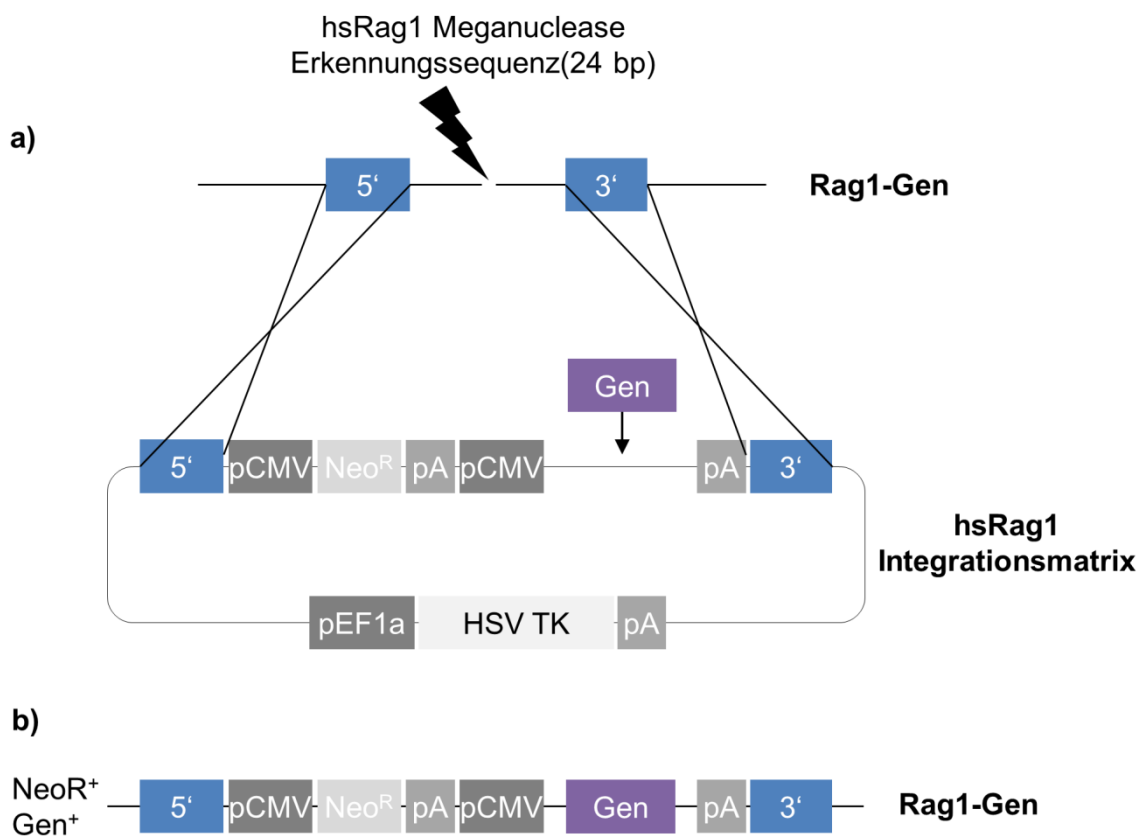


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des cellular Genome Positioning Systems (cGPS®). a) Die erste Hauptkomponente, die hsRag1-Meganuklease, induziert an ihrer spezifischen Erkennungssequenz im Rag1-Gen einen Doppelstrangbruch. In die zweite Hauptkomponente, das hsRag1-Integrationsmatrix-Plasmid kann das gewünschte Gen kloniert werden und ist dann flankiert von zwei zum Rag1-Gen homologen Bereichen. Diese Bereiche können bei der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination als Vorlage dienen (gekreuzte Linien), dadurch werden die zwischen den Bereichen liegenden Sequenzen ins Genom integriert (in b) dargestellt: NeoR⁺, Gen⁺) NeoR=Neomycin-Resistenzgen; pA=Polyadenylierungssignal; pCMV=Cytomegalievirus-Promotor, pEF1a=Elongationfactor 1a Promotor; HSV=TK Herpes Simplex Virus Thymidinkinase-Gen (Modifiziert nach: cGPS Custom Guidelines (Bioresearch, 2010))

4.1.11.2 PCR zu Identifikation von HR+ Klonen

Für das Auffinden von Zellklonen, die die klonierten Konstrukte im Rag1-Locus durch homologe Rekombination (im Folgenden als HR+ bezeichnet) integriert hatten, wurde eine PCR durchgeführt. Die PCR, welche schematisch in **Abb. 4-2** dargestellt ist, kann nur erfolgreich einen ca. 1,5 kb großen DNA-Abschnitt amplifizieren, wenn es tatsächlich zur Integration durch homologe Rekombination gekommen ist, da der *forward* Primer innerhalb des integrierten Konstruktes bindet.

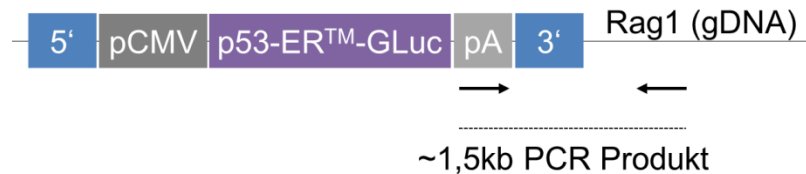


Abb. 4-2: Schema der PCR zur Identifizierung von HR+ Klonen welche das p53-Konstrukt per homologer Rekombination integriert haben. Der *forward* Primer bindet hierbei in der Sequenz für das Polyadenylierungs-Signal (pA) innerhalb des integrierten DNA-Abschnittes, der *reverse* Primer außerhalb im Rag1-Gen. (gDNA=genomische DNA).

Um die generelle Qualität der gDNA zu testen, wurde außerdem eine Kontroll-PCR mit Primern, welche in 5'-Richtung außerhalb der Stelle der homologen Rekombination liegen, etabliert.

Tab. 2: PCR-Reaktionsansätze zur Identifikation von HR+ Klonen

cGPS-PCR		Kontroll-PCR	
Komponente	V (µl)	Komponente	V (µl)
Template gDNA	2,00	Template gDNA	1,00
10x Coral Load Puffer	5,00	5x GoTaq Green Puffer	5,00
dNTP's 10 mM	1,00	dNTP's 10 mM	0,50
Primer forward, 10 µM	2,00	Primer forward, 10 µM	1,25
Primer reverse, 10 µM	2,00	Primer reverse, 10 µM	1,25
HotStarTaq Plus	0,50	GoTaq Polymerase	0,25
H ₂ O, steril	Ad 50	H ₂ O, steril	Ad 25

Tab. 3: PCR-Parameter zur Identifikation von HR+ Klonen

cGPS-PCR				Kontroll-PCR		
Schritt	T (°C)	Dauer	Zyklen	T (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Min.	1	95	5 Min.	1
Denaturierung	95	1 Min.		95	30 Sek.	
Primerhybridisierung	56	1 Min.	35	69	30 Sek.	35
Elongation	72	90 Sek.		72	90 Sek.	

Finale Elongation	72	10 Min.	1	72	5 Min.	1
Haltephase	4	∞	1	4	∞	1

4.2 Analyse von DNA und Klonierungstechniken

4.2.1 Transformation von kompetenten E.Coli Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen von freier DNA in kompetente Bakterienzellen.

Transformation von elektrokompetenten E.Coli Bakterien

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird kurzzeitig die Permeabilität der Zellwände der Bakterien erhöht und ermöglicht so die Aufnahme von DNA. Elektrokompetente Bakterien wurden zunächst von der Lagerung bei -80°C auf Eis überführt und aufgetaut. 2 μl eines Ligationsansatzes (entspricht ca. 20 ng DNA) wurden zu den Bakterien gegeben und dann der ganze Ansatz in eine eiskalte Elektroporationsküvette (1mm) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mithilfe des MicroPulsers (BioRad) mit dem Programm „Bacteria“. Nach 2 Minuten Ruhephase auf Eis wurden 500 μl LB Medium zugegeben, die Suspension in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und 60 Minuten bei 37°C , 220 rpm geschüttelt. Je nach Kompetenz der Bakterienstämme wurde nur ein Teil oder die ganze Suspension auf LB-Agar Platten mit einem Selektionsantibiotikum entsprechend der Resistenz des Vektors ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um resistente Klone zu bekommen.

Transformation von chemisch kompetenten E.Coli Bakterien

Die chemisch kompetenten Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut und dann wie oben beschrieben die gewünschte DNA zum Ansatz gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und dann sofort für 5 Minuten auf Eis gesetzt. Danach wurden 500 μl LB Medium zugegeben und ansonsten wie bei den elektrokompetenten Bakterien verfahren.

4.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus E.Coli

Um vervielfältigte Plasmid-DNA aus transformierten E.Coli zu gewinnen, wurde je nach Maßstab entweder eine Mini- oder eine Midi-Präparation der DNA durchgeführt.

Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Je 5 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikazusatz (1:1000) wurden mit je einer Bakterienkolonie aus der zuvor über Nacht inkubierten Agarplatte mithilfe einer sterilen Pipettenspitze angeimpft. Meist wurden zwischen 3 und 12 Kolonien gepickt, je nach

erwarteter Ligationseffizienz. Die Reagenzgläser wurden dann über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden je 2 ml dieser Bakterienkultur in ein Reagiergefäß gegeben und 1 Minute bei 16000 × g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde dann in 300 µl Puffer 1 resuspendiert, die darin enthaltene RNase degradiert dabei ungewünschte niedrig-molekulare RNA. Durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 wird eine alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) der Bakterienzellen eingeleitet. Das im Puffer 2 enthaltene Natriumhydroxid und SDS zerstören die Zellwände, genomische DNA wird durch NaOH denaturiert und Proteine sowie hoch-molekulare RNA mit SDS ausgefällt. Plasmid-DNA liegt hauptsächlich in einer *supercoiled* Form vor und ist daher nicht empfindlich für die Denaturierung durch SDS und NaOH. Der Ansatz wird 5 Minuten auf Eis inkubiert, danach wird durch Zugabe von Puffer 3 die Lösung wieder neutralisiert und das SDS mitsamt den daran gebundenen Bestandteilen präzipitiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16000 × g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt, in dem 700 µl Isopropanol vorgelegt waren. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 30 Minuten. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl 70% Ethanol aufgenommen und nochmals für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach 15-minütiger Trocknung in 50 µl ddH₂O für 30 Minuten im Thermomixer gelöst.

Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midi-Präparation)

100 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium wurden mit 100 µl der Übernachtskultur eines vorher per Restriktionsanalyse positiv getesteten Klonen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Für die Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das *NucleoBond Xtra Midi Kit* (Machery-Nagel) eingesetzt und das Protokoll gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in ddH₂O eluiert und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop

Mithilfe des NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific) kann photometrisch die Konzentration von DNA und RNA bestimmt werden. Das Prinzip basiert auf der Absorption von Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Für Nukleinsäuren liegt die spezifische optische Dichte bei 260 nm, für Proteine bei 280 nm. Über die Formel $c(\text{DNA}) = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml}$ kann so die Konzentration bestimmt werden, zusätzlich ist es über die Ratio $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ möglich, Aussagen über die Reinheit der DNA zu treffen. Diese sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.2.4 Restriktionsanalyse von DNA

Um Plasmid-DNA genauer zu charakterisieren, wurde entsprechende DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen analysiert. Dies sind bakterielle Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und schneiden und durch deren gezielten Einsatz es somit möglich ist, DNA-Fragmente definierter Größen zu erhalten. Ein typischer Ansatz zur Analyse von Klonen einer Mini-Präparation einer neuen Ligation sah wie folgt aus:

Tab. 4: Reaktionsansatz zur Restriktionsanalyse von DNA

Komponente	V (µl)
DNA aus Mini-Präparation	3,0
Restriktionsenzym	0,2
Reaktionspuffer 10x	2,0
ddH ₂ O	ad 20

Der Ansatz wurde gut gemischt, für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

Restriktionsenzyme wurden neben der Analyse von DNA auch zum Linearisieren von Vektoren und Ausschneiden von Inserts verwendet. Dabei wurde eine definierte Menge DNA mit einem Überschuss an Enzym über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.5 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Für die Gelelektrophorese von DNA macht man sich die negative Ladung selbiger zunutze, welche bewirkt, dass die Moleküle in einem elektrischen Feld zu Anode wandern. Dies geschieht je schneller, desto kleiner das Fragment ist. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde ethidiumbromid-haltiges Agarosegel verwendet. Anhand eines mitgeführten Längenstandards konnte dann unter UV-Licht (Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert bei 254 nm) die Größe bestimmt werden.

Für das Gel wurde je nach Größe und gewünschter Konzentration die entsprechende Menge Agarose abgewogen und in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Zumeist wurde ein 1 % Agarosegel benutzt, da dieses eine gute Auftrennung im Bereich von ca. 0,8 bis 10 kB Fragmentgröße gewährleistet. Nach Zugabe von Ethidiumbromid wurde die Flüssigkeit in einen Gelträger mit Kamm gegossen, um es nach Aushärtung in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer zu setzen. Zu der zu analysierenden Probe wurde 1/4 Volumen 4x Ladepuffer gegeben und der Ansatz dann in eine Geltasche pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 90-100 V wurde dann die Auftrennung durchgeführt. Die Visualisierung der dabei entstandenen Banden wurde unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm durchgeführt.

4.2.6 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Um ein bestimmtes Fragment DNA für eine weitere Verwendung (z.B. Ligation) zu isolieren, wurde das Wizard SV® Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega) verwendet. Zunächst wurde das gewünschte Fragment unter möglichst kurzer Visualisierung unter UV-Licht ausgeschnitten, im Weiteren wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

4.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Monoligation eines mit Restriktionsenzymen linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5' Enden vor der Ligation dephosphoryliert. Dafür wurden nach erfolgter Spaltung per Restriktionsenzym je μg DNA ein μl FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase (Fermentas) und die gleiche Menge Reaktionspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und das Enzym dann für 5 Minuten bei 80°C deaktiviert.

4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein linearisierter Vektor wurde mit dem gewünschten DNA-Insert mittels der T4-DNA-Ligase (Fermentas) verknüpft. Die Ligase katalysiert die Bindung von einem freien 5' Phosphat-Ende mit einer freien 3'-Hydroxy-Gruppe einer doppelsträngigen DNA. Für die Ligation wurden 50 ng Vektor mit einem 3-fach molaren Überschuss von Insert eingesetzt:

$$\text{Insert}(ng) = 3 \times \left(\frac{\text{Insert Länge (bp)}}{\text{Vektor Länge (bp)}} \right) \times 50 \text{ ng Vektor}$$

Tab. 5: Reaktionsansatz einer typischen Ligationsreaktion.

Komponente	V (μl)
Insert DNA	x
Vektor	x
T4 Ligase Puffer	1
T4 Ligase	1
H ₂ O	ad 10

4.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von kleinsten Mengen DNA in vitro mithilfe einer DNA-Polymerase. Durch Verwendung sequenzspezifischer Primer gelingt die Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes. Der grundsätzliche Ablauf kann in drei Phasen unterteilt werden. In der *Denaturierungsphase* wird die DNA bei Temperaturen von 95°C in Einzelstränge gespalten. Darauf folgt die *Primerhybridisierung*: Die 20-30bp langen Oligonukleotide lagern sich bei 55-65°C an die passenden Abschnitte der DNA an. In der *Elongationsphase* füllt die

DNA-Polymerase bei 68-72°C die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf, sie beginnt dabei am 3'-Ende des jeweiligen Primers und folgt dann dem anderen DNA-Strang. Dieser Zyklus wird je nach Anwendung 30-35-mal wiederholt, dabei erfolgt eine exponentielle Anreicherung der Zielsequenz, welche nachher in einer Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden kann (Mullis et al., 1986).

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu benutzt, DNA zur späteren Subklonierung aus Plasmiden zu amplifizieren sowie zum Nachweis bestimmter Sequenzen aus genomischer DNA. Dabei wurde die entweder die GoTaq® (Promega) oder die PfuUltra Hotstart DNA Polymerase (Agilent) verwendet, welche zusätzlich zur Polymerase- noch eine 3'-5'-*Exonuclease-Aktivität* besitzt, also den Einbau falscher Nukleotide erkennen und beseitigen kann (*Proof Reading Aktivität*). Dies senkt die Wahrscheinlichkeit von Mutationen während der PCR auf ein Minimum $4,3 \times 10^{-7}$ /Basenpaarverdopplung. Folgende Ansätze wurden verwendet:

Tab. 6: Reaktionsansatz und Parameter für eine PCR mit PfuUltra Hotstart Polymerase

Komponente	V (µl)	Schritt	Temperatur	Dauer	Durchläufe
Template DNA 10ng/µl	1,00	Initiale Denaturierung	95 °C	2 Min.	1
5x GoTaq Puffer	2,50	Amplikation			
dNTP's 10 mM	0,50	Denaturierung	95 °C	30 Sek.	
(DMSO)	1,25	Primerhybridisierung	Nach Tm	30 Sek.	35
Primer forward, 10 µM	1,25	Elongation	72 °C	1 Min./kb	
Primer reverse, 10 µM	1,25	Finale Elongation	72 °C	12 Min.	1
PfuUltra Hotstart	0,50	Haltephase	4 °C	∞	1
H ₂ O, steril	Ad 25				

Tab. 7: Reaktionsansatz und Parameter für eine PCR mit GoTaq® Polymerase

Komponente	V (µl)	Schritt	Temperatur	Dauer	Durchläufe
Template DNA 10ng/µl	1,00	Initiale Denaturierung	95 °C	3 Min.	1
5x GoTaq Puffer	10	Amplikation			
dNTP's 10 mM	1	Denaturierung	95 °C	30 Sek.	
(DMSO)	1,25	Primerhybridisierung	Nach Tm	30 Sek.	35
Primer forward, 10 µM	2,5	Elongation	72 °C	1 Min./kb	
Primer reverse, 10 µM	2,5	Finale Elongation	72 °C	8 Min.	1
GoTaq® (5U/ul)	0,25	Haltephase	4 °C	∞	1
H ₂ O, steril	Ad 50				

Die einzelnen Komponenten wurden unter einer PCR Abzugshaube zunächst ohne DNA als Master Mix pipettiert, auf 0,2 ml Reagiergefäße verteilt, die jeweilige DNA

zugegeben und kurz abzentrifugiert. Zum Nachweis erfolgter zielgerichteter Integration wurden andere Ansätze verwendet, die unter 4.1.11.2 beschrieben sind.

4.2.10 TOPO®-Zero-Blunt- und TOPO®-TA-Klonierung

Hierbei handelt es sich um eine von Life Technologies entwickelte Ligase-freie Klonierung von blunt-end PCR-Produkten in einen vorgegebenen Vektor, den TOPO® pCR-BluntII-Vektor bzw. von PCR-Produkten mit TA-Überhang in den pCR™2.1-TOPO® durch das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia Virus*. Der Vektor liegt linearisiert und mit dem an die freien 5'-Phosphat-Enden der DNA gebundenem Enzym Topoisomerase I vor. Die freie 3'-OH-Gruppe des PCR Produkts greift diese Bindung an und das Enzym katalysiert die Ligation in den Vektor. Für die Reaktion mit anschließender Transformation in chemisch-kompetente E.Coli wurde folgender Ansatz verwendet:

Tab. 8: Reaktionsansatz einer TOPO®-Klonierung

Komponente	V (µl)
Frisches PCR-Produkt	0,5
Salzlösung	1,0
ddH2O	3,5
TOPO Vektor	1,0

Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurden 2 µl der Reaktion in der Transformationsreaktion (siehe 4.2.1) verwendet.

4.2.11 Klonierung mit der Gateway®-Technologie

Die Technik des Gateway-Systems basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen *Lambda*, welcher mit dieser Technik in das bakterielle Genom integriert. Zwei wichtige Bestandteile sind vonnöten: Die DNA-Rekombinationsstellen (attachment sites, att-sites), welche sich je nach Vektor unterscheiden (s.u.) und Enzyme, welche die Reaktion katalysieren (Rekombinasen). Damit ist es möglich, bestimmte DNA Abschnitte Ligase-frei von einem Vektor in den anderen zu transferieren.

Zunächst muss ein sogenannter *Entry*-Vektor (hier pENTR4-DualSelection (Life Technologies)) mit der gewünschten DNA-Sequenz erzeugt werden. Hierfür wurden die üblichen Klonierungstechniken Restriktion/Ligation verwendet, um DNA-Abschnitte in den pENTR4-Vektor zu bringen. In diesem Vektor ist die eingefügte DNA dann von attL-Rekombinationsstellen flankiert. Als zweiter Schritt muss noch ein Zielvektor (*Destination-Vektor*) erzeugt werden. Jeder beliebige Vektor kann über den Einbau der Gateway-Reading-Frame-Cassette (Life Technologies) in einen solchen umgewandelt werden. Die Kassette enthält attR-sites, die ein Chloramphenicol-Resistenz- sowie ein ccdB-Gen flankieren. Wird letzteres exprimiert, hemmt es die bakterielle Gyrase und damit das

Wachstum normaler E.Coli-Bakterien. Bei der Rekombinationsreaktion (LR-Reaktion) kommt es zum Austausch der Sequenzen zwischen Entry-Vektor und Destination-Vektor, so dass zum einen ein neuer Expressionsvektor entsteht und zum anderen ein Nebenprodukt, welches das *ccdB*-Gen trägt. Transformierte Bakterien können nun außerdem mit Ampicillin selektiert werden. Dies bedingt, dass fast ausschließlich Kolonien wachsen, die den Expressionsvektor tragen.

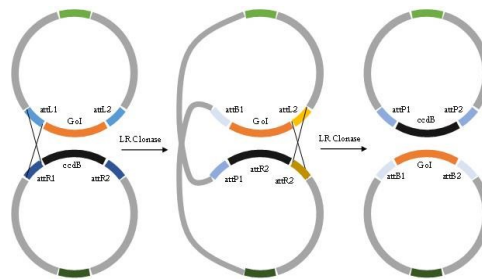


Abb. 4-3: Funktionsweise der sequenzspezifischen Rekombination (Gateway Technology) zwischen den attL-sites des Entry-Vektors und den attR-sites des *Destination* Vektors. Modifiziert nach (Hartley et al., 2000)

Zur Herstellung eines *Destination*-Vektors wurde das Gateway® Vektor Conversion System (Life Technologies) benutzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die LR-Reaktion wurde der Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix (Life Technologies) verwendet.

4.2.12 Sequenzierung von DNA

Die korrekte Basenabfolge von DNA-Inserts nach Klonierungen und PCR-Produkten nach Amplifikationen sowie der p53-Status von Zellklonen wurden per DNA-Sequenzierung überprüft. Es wurde der Sequenzierungsservice der Firma LGC Genomics, Berlin in Anspruch genommen und Proben nach den entsprechenden Anforderungen vorbereitet. Hierzu wurde 1 µg Plasmid-DNA bzw. 200 ng PCR-Produkt zusammen mit 2 µl der entsprechenden Primern (10 µM Verdünnung) gemischt und auf 14 µl H₂O aufgefüllt.

4.2.13 Isolation von genomischer DNA aus Zellen

Um DNA für die PCR zur Identifikation von von HR+ Klonen (cGPS) und für die Sequenzierung des p53-Status zu gewinnen, wurden Zellen in PBND-Puffer mit 4 µg/µl Proteinase K über Nacht bei 800 rpm, 55°C lysiert und die Proteinase K am nächsten Tag für 10 Minuten bei 95°C inaktiviert. Im Folgenden wurden die Zelltrümmer für 1 Minute bei 16000 × g abzentrifugiert. Für die PCR wurden dann entweder direkt 1 µl eingesetzt oder die DNA noch mit dem peqGOLD Tissue DNA Kit (PeqLab) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

4.3 Analyse von RNA

4.3.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Vermeidung der Kontamination mit RNasen wurden alle Arbeitsflächen vorher gründlich mit 70 % Ethanol desinfiziert, nur RNase-freie Materialien sowie ein eigener Satz Pipettenspitzen mit Filter benutzt. Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy-Mini Kit (Qiagen) eingesetzt. Zunächst wurde das Medium aus einer 60 mm Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen 2x in PBS gewaschen und 350 µl RLT-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden dann mittels eines Gummischabers geerntet, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und gevortext. Im Weiteren wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.3.2 cDNA-Synthese

Vor einer Genexpressionsanalyse per quantitativer PCR ist es notwendig, die RNA mittels einer reversen Transkriptase (RT) in DNA umzuschreiben, da die Polymerasen in der PCR DNA-abhängig sind. Hierzu wurde das SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) mit in folgender Tabelle dargestelltem Reaktionsansatz eingesetzt und im Weiteren nach Angaben des Herstellers verfahren.

Tab. 9: Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese

Komponente	V (µl)
RNA (1 µg)	x
5x VILO™ Reaction Mix	2
10x SuperScript® Enzyme Mix	1
Rnase-freies H ₂ O	Ad 10

4.3.3 Quantitative PCR

Eine q-PCR erlaubt im Gegensatz zur konventionellen PCR eine Quantifizierung der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine qPCR mit vorgeschalteter reverser Transkription (q-RT-PCR) durchgeführt, um die relative Expression bestimmter Gene zu quantifizieren. Das Prinzip dabei ist der Einsatz von Primern, die spezifisch für die cDNA des zu untersuchenden Gens sind, sowie die Verwendung eines bevorzugt an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffes (hier: SYBRgreen I), der grünes Licht einer Welllänge von 521 nm emittiert. Durch Messung der Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus können Rückschlüsse auf die vorliegende Menge der amplifizierten DNA gezogen werden. Zu Beginn einer PCR ist dabei nur unspezifisches Hintergrundsignal messbar, da die vorliegende Menge an DNA noch sehr klein ist. Ab einem bestimmten Punkt nehmen die Menge der DNA und damit die

Floureszenzintensität exponentiell zu. Der Zyklus, an dem die Intensität erstmals das Hintergrundsignal überschreitet, entspricht dem sog. *Cycle threshold* (Ct)-Wert. Je mehr cDNA des zu untersuchenden Gens in der Reaktion war, desto früher wird diese Grenze überschritten und desto kleiner ist der Ct-Wert, der daher zur Quantifizierung herangezogen wird (s.u.)

Die Analyse jeder Probe erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung, zusätzlich wurde für jedes Primerpaar eine Kontrolle ohne cDNA (NTC, *non template control*) mitgeführt. Ein typischer Ansatz ist in Tab. 10 gezeigt.

Tab. 10: Reaktionsansatz für eine qPCR

Komponente	V (µl)
2x SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix	12,50
Primer forward	0,50
Primer reverse	0,50
cDNA	1,00
ROX	0,25
H ₂ O, steril	10,25
Gesamt	25,00

Die Komponenten wurden auf Eis unter einer PCR Abzugshaube in 96-well Platten pipettiert. Diese wurden mit einer Folie versiegelt und vor der PCR kurz abzentrifugiert. Tab. 11 zeigt das am RealTime PCR Cycler MX3005P (Stratagene) gewählte Temperaturprofil.

Tab. 11: Temperaturprofil für eine qPCR

Schritt	T (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 Min.	1
Amplifikation	94	15 Sek.	40
Denaturierung	60	30 Sek.	
Primerhybridisierung	72	40 Sek.	
Elongation			
Schmelzkurve			
Denaturierung	95	1 Min.	1
Niedrigste Temp.	55		
Ansteigend		30 Min.	
Höchste Temp.	95	30 Sek.	
Haltephase	4	∞	1

Zur Auswertung wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet (Livak und Schmittgen, 2001). Zur Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes wird zunächst ein Zielgen zu einem Referenzgen („Haushaltsgen“, hier GAPDH) in Bezug gesetzt:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen})$$

Anschließend wird dieser Wert zu einer Kontrolle in Bezug gesetzt, z.B. zu unbehandelten Zellen, um eine Zu- oder Abnahme der Expression bewerten zu können:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Probe}) - \Delta Ct(\text{Kontrolle})$$

Die Werte wurden anschließend noch in relative Werte umgerechnet:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct(\text{Probe})}$$

4.4 Analyse von Proteinen

4.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Bei einer ca. 95%igen Konfluenz wurde das Medium von Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale entfernt, 2x mit PBS gewaschen und 200 μ l NP40 Puffer mit zugesetztem Protease-Inhibitor zugegeben. Mit einem Gummischaber wurden die Zellen auf Eis geerntet und in ein eiskaltes 1,5 ml Reagiergefäß gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das Lysat 15 Minuten bei 16000 \times g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues, eiskaltes 1,5 ml Reagiergefäß gegeben. Die Lysate wurden anschließend bei -80°C gelagert.

4.4.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der Bradford-Assay eingesetzt. Hierzu wurden jeweils 2 μ l Proteinlysate in 400 μ l PBS gegeben, langsam mit 100 μ l Bradford-Reagenz (BioRad) versetzt und gevortext. Die Extinktion jeder Probe bei 595 nm wurde in Dreifachbestimmung in einem Multiplaterereader gemessen. Anhand eines mitgemessenen Proteinstandards (BioRad) mit einer Konzentration von 1,38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konnte dann die Konzentration berechnet werden.

4.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient dazu, Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. SDS ist ein anionisches Molekül, welches dafür sorgt, dass die Proben negativ geladen sind und die Eigenladung der Proteine maskiert wird. Zusätzlich werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Zusammen führt dies dazu, dass die Proteine fast ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld wandern und aufgetrennt werden. Das Gel besteht aus 2 Teilen, dem Sammel- und dem Trenngel. In Ersterem werden die Proben konzentriert, um

Ungleichheiten in der Beladung der Taschen auszugleichen, um dann im Trenngel der Größe nach aufgetrennt zu werden.

Für selbst gegossene Gele wurden Polyacrylamid, Tris-HCL-Puffer (Trenngel: pH 8,8; Sammelgel: pH 6,8) und Wasser in entsprechenden Verhältnissen gemischt, Ammoniumpersulfat als Initiator und Tetramethylethyldiamin als Katalysator der Polymerisierungsreaktion zugegeben. Nach Erhärten konnte der zuvor eingesteckte Kamm zur Ausformung der Probestaschen entfernt werden.

Es wurden pro Probe 50 µg Proteinlysate mit Lysepuffer auf 20 µl aufgefüllt und 5 µl 4x Ladepuffer (RotiLoad) zugegeben. Die Proben wurden dann 10 Minuten bei 95°C denaturiert und 1 Minute bei 16000 × g zentrifugiert um Luftblasen zu entfernen. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer, welche mit SDS-Laufpuffer befüllt wurde, gesetzt und die Taschen mit Proben beladen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 30 Minuten wurden die Proben im Sammelgel konzentriert, für das Trenngel wurde die Spannung auf 125-150 V erhöht.

Für manche Anwendungen wurden auch NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Fertiggele (Life Technologies) verwendet, hierbei wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

4.4.4 Western Blot und Detektion

Um bestimmte Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können, mussten die aufgetrennten Proteine zunächst vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL, Amersham) übertragen werden. Dafür wurde die Wet-Blot Methode verwendet und der Blot wie folgt zusammengebaut: Anode – Fasermatte – Whatman-Filterpapier – Membran – Gel – Whatman-Filterpapier – Fasermatte – Kathode. Es folgte das Anlegen einer konstanten Stromstärke von bis zu 400 mA für 90 Minuten, dabei wurde die Pufferlösung extern auf 10 °C gekühlt und ständig gerührt.

Anschließend wurde die Membran für mindestens eine Stunde mit einer Lösung aus 10 % Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % blockiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde der primäre Antikörper in 5 % Milch in entsprechender Verdünnung zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 Minuten in TBS-T 0,1 % gewaschen, dann der Sekundärantikörper, an den eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, in 5 % Milch zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nun 4 x 5 Minuten gewaschen, danach erfolgte eine Inkubation mit SuperSignal West Dura Extended (Pierce) nach Angaben des Herstellers. Das darin enthaltene Substrat Luminol wird durch die HRP oxidiert, dabei wird eine Chemilumineszenz frei, welche auf einem Röntgenfilm in einer Dunkelkammer detektiert werden wurde.

4.4.5 Luziferase Assay

4.4.5.1 Firefly Luziferase Assay

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Reporterplasmide mit dem Gen einer Firefly Luziferase verwendet (siehe 5.2.5). Dieses kodiert für ein 61 kDa großes Protein, das die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin unter ATP-Verbrauch und Freisetzung von Licht katalysiert, welches im Luminometer detektiert werden kann.

Der Reporterassay wurde jeweils im 96-well-Format durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 10000 Zellen pro well ausgesät. Dann erfolgte die Transfektion wie unter 4.1.4 angegeben, mit 50 ng Expressionsplasmid, 50 ng Reporterplasmid und 100 ng pUC19 Leervektor. 18 Stunden später wurde 4-OHT wie unter 4.1.10 beschrieben zugegeben und nach einer Inkubation von 12 Stunden das Medium abgesaugt. Durch Zugabe von 5 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega) und 20 Minuten Schütteln bei 800 rpm wurde die Zelllyse eingeleitet. Anschließend erfolgte die automatisierte Zugabe von 25 µl Luziferase-Reagenz über einen Injektor am Luminometer mit direkt anschließender Messung für 5 Sekunden.

4.4.5.2 Gaussia Luziferase Assay

Diese Luziferase (entdeckt in *Gaussia princeps*, im Folgenden GLuc genannt) wird aus Säugetierzellen natürlicherweise sekretiert, d.h. sie ist im Medienüberstand in Zellkultur oder im Plasma von Versuchstieren messbar. Sie katalysiert die Oxidation ihres Substrates Coelenterazin unter Freisetzung von Licht mit einem Emissionsmaximum bei 480 nm (Tannous et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität der Gaussia Luziferase (GLuc) in Zellkulturüberständen gemessen.

Für Zeitverlaufsexperimente wurden die Überstände in 96-well Platten gesammelt und bei -20 °C gelagert. Zur Messung wurden alle Überstände gleichzeitig aufgetaut, fünf Minuten auf einem Thermomixer geschüttelt und jeweils 2 x 5 µl auf eine 96-well Luminometer Messplatte mit spitzem Boden (Greiner) überführt. Die Messung erfolgte nach automatisierter Injektion von 50 µl Coelenterazin (10 mM Stocklösung 1:500 in PBS verdünnt) für 5 Sekunden im Orion II Luminometer (Berthold) (Charles et al., 2014; Tannous, 2009).

4.4.5.3 Cypridina Luziferase Assay

CLuc (eine Luziferase aus *Cypridina noctiluca*) katalysiert die Oxidation ihres Substrates Vargulin unter Freisetzung von blauem Licht der Wellenlänge 465 nm.

Die Messung erfolgte nach Zugabe von 25 µl verdünnter Vargulin-Lösung (NEB) für 5 Sekunden im Orion II Luminometer (Berthold) (Charles et al., 2014).

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkulturmodell mit Zellen aus einem humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, NCI-H1299 (Phelps et al., 1996) etabliert und der Einfluss von fünf verschiedenen H1-Helix Mutationen, welche die kooperative Bindung von p53 an die DNA verändern, innerhalb dieses Zellkulturmodells charakterisiert.

5.1 Generierung eines Expressionssystems

5.1.1 Vorüberlegungen

Die verwendeten Zelllinien entstammen einer Metastase eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, zeigen eine homozygote, partielle Deletion von p53 und exprimieren das Protein daher nicht. Sie sekretieren das Peptid Neuromedin B, welches auf die Zellen als autokriner Wachstumsfaktor über die Transaktivierung von EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) wirkt (Giaccone et al., 1992; Moody et al., 2010). Bei ektopischer Expression von p53 ist daher bei derartig transformierten Zellen eine sofortige und starke p53-vermittelte Reaktion zu erwarten – je nach Art der H1-Helix-Interaktion Apoptose oder Zellzyklusarrest. Aus diesem Grund wurde entschieden, ein induzierbares Konstrukt zu verwenden. Hierzu wurde p53 mit die Liganden-Bindungs-Domäne eines modifizierten murinen Östrogen-Rezeptors (im folgenden ER^{TAM} genannt) (siehe 4.1.10) fusioniert; dieser ist transkriptionell inaktiv und transloziert nur durch Zugabe des synthetischen 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) vom Zytosol in den Nucleus (Littlewood et al., 1995; Putzer et al., 2000), was die gezielte Induktion von p53 in den Zelllinien ermöglicht. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund einer möglichen späteren Anwendung in Xenograft-Modellen ein wichtiger Aspekt.

Des Weiteren trat in den vorhergehenden Arbeiten das Problem auf, dass die Zellen die Expression der als viraler Vektor restituierten p53-Konstrukte verloren. Möglicherweise spielten hierbei epigenetische Modifikationen als Mechanismen der zellulären Genrepression eine Rolle, die im Zusammenhang mit viralen Vektoren als *retrovirus silencing* bekannt sind (Swindle und Klug, 2002). Zum einen wurde daher kein viraler Vektor verwendet, zum anderen ein Reporter eingesetzt, um diesen und mögliche andere Wege der Geninaktivierung frühzeitig beobachten zu können. Eine *Gussia* Luziferase (GLuc) sollte als Reporter für die Expression von p53 über eine T2A (*Thosea asigna* 2A)-Sequenz an das induzierbare p53 gekoppelt werden. GLuc ist ein natürlicherweise sekretiertes Photoprotein, welches sein Substrat unter Emission von Photonen oxidiert und daher im Medienüberstand in Zellkultur oder im Plasma von Versuchstieren nachgewiesen werden

kann (Tannous, 2009; Tannous et al., 2005). 2A-ähnliche Sequenzen vermitteln in vielen Viren die "Spaltung" von multiplen Proteinen in einzelne und können daher genutzt werden, um verschiedene Proteine vom selben Transkript zu generieren. Alle 2A-ähnlichen Sequenzen haben ein kanonisches Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^(2A)↑Pro^(2B) Motiv, an dem über einen ribosomalen „Sprung“-Mechanismus keine Peptidbindung zwischen dem 2A-Glycin und dem 2B-Prolin hergestellt wird und der N-terminale Teil aus der Translationsmaschinerie freigesetzt wird (Donnelly et al., 2001; Osborn et al., 2005).



Abb. 5-1: Design des Expressionssystems. Die verschiedenen p53-H1-Helix-Mutanten (p53*) sind mit einem modifizierten Östrogen-Rezeptor (ERTAM) fusioniert, eine T2A-Sequenz führt zur Abspaltung der Gaussia-Luziferase (GLuc) bei der Translation.

Grundsätzlich wurden zunächst die einzelnen Elemente in einen pENTR4-DualSelection Vektor (Life Technologies) kloniert, um in späteren Schritten die Vorzüge der Gateway®-Technologie (s. 4.2.11) nutzen zu können.

5.1.2 Klonierung des modifizierten Östrogen-Rezeptors

Der modifizierte Östrogen-Rezeptor (ERTAM) wurde in zwei Schritten in das in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Plasmid pENTR4-T2A gebracht. Zunächst erfolgte die Exzision des 5'-Endes des oben beschriebenen Östrogen-Rezeptors aus einem in der Gruppe vorhandenen Plasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI, zeitgleich wurde das Plasmid pENTR4-T2A mit denselben Enzymen linearisiert. Nun erfolgte die Ligation von Insert und Vektor mittels einer Ligase, mit dem Ligationsansatz wurden anschließend DH10B-elektrokompetente E.Coli transformiert. Per Restriktionsanalyse mit BamHI und KpnI wurde ein korrekt transformierter Klon, der das 777 bp große Fragment sowie das Vektor-Rückgrat von 2337 bp aufwies, ausgewählt. **Abb. 5-2** zeigt die Klonierungsstrategie sowie die Banden im Agarosegel.

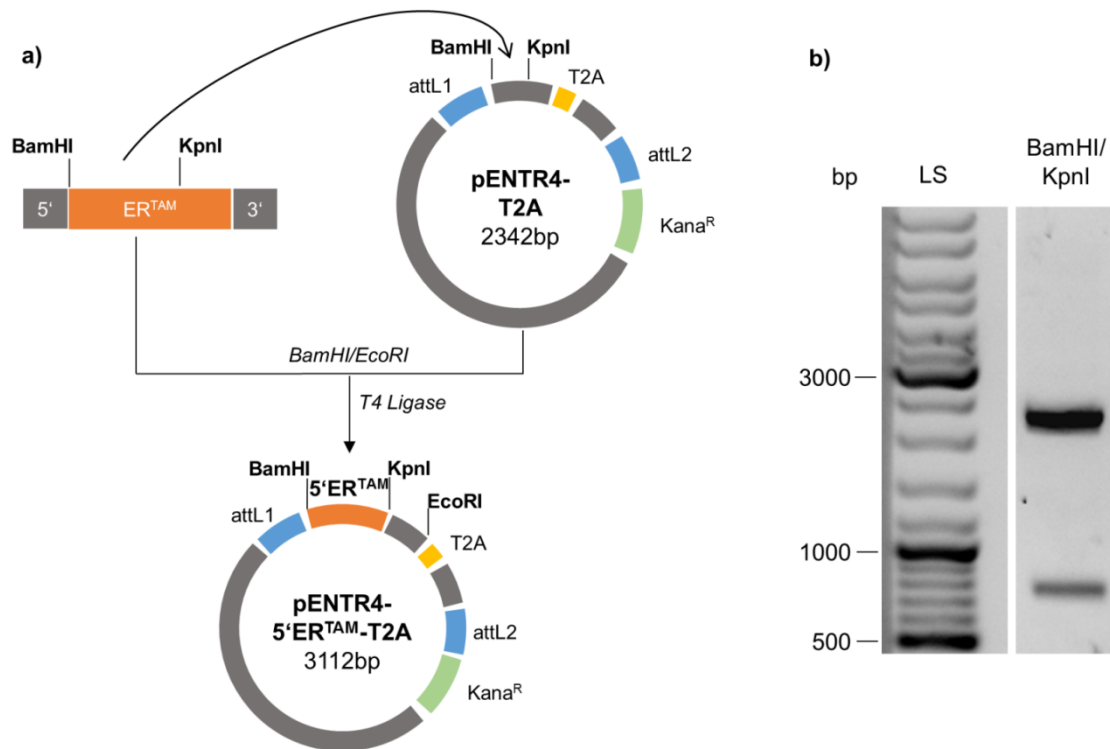


Abb. 5-2: Klonierung des 5'-Anteils des Östrogen-Rezeptors. In a) ist die Klonierungsstrategie gezeigt: Mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und KpnI wurde 5'-ER^{TAM} aus einem in der AG vorhandenen Plasmid ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pENTR4-T2A ligiert. In b) ist das Agarosegel eines mit dem resultierenden Plasmid pENTR4-5'-ER^{TAM}-T2A korrekt transformierten Klons mit den Banden 777 bp (5'-ER^{TAM}) sowie 2337 bp (Vektor-Rückgrat) gezeigt. (LS=Längenstandard)

Das 3'-Anteil von ER^{TAM} wurde per PCR aus dem gleichen Plasmid amplifiziert. Grundüberlegung beim Design der Primer war, dass die Translation über die T2A-Sequenz weiter zur Gaussia Luziferase fortschreiten soll, um die Expression sowohl des p53-ER^{TAM}-Fusionsproteins als auch der Luziferase als Reporter zu gewährleisten. Der *forward*-Primer ist vollständig komplementär zur Sequenz und hat eine KpnI-Schnittstelle, während der *reverse*-Primer so designiert wurde, dass er nur bis zum Anfang des Stoppcodon komplementär ist, dieses dann ersetzt sowie eine EcoRI-Restriktionsstelle an das 3'-Ende anhängt. Mithilfe dieser Primer wurde in einer PCR mit einer *Proofreading* (*Pfu*)-Polymerase die Sequenz amplifiziert und das PCR-Produkt gelelektrophoretisch isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde, wie unter 4.2.10 beschrieben, das Fragment per TOPO-Klonierung in den pCR-Blunt-II-TOPO Vektor gebracht. Die korrekte Sequenz von 3'-ER^{TAM} wurde per Sequenzierung bestätigt. Als nächstes wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen KpnI und EcoRI aus dem Plasmid ausgeschnitten, während gleichzeitig das Zielplasmid pENTR4-5'-ER^{TAM}-T2A mit den gleichen Enzymen linearisiert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurden wiederum DH10B-elektrokompetente E.Coli transformiert. Nach Plasmidisolation aus Übernachtskulturen wurde dann per Restriktionsanalyse ein richtig transformierter Klon ausgewählt und eine Midi-Präparation angefertigt. **Abb. 5-3** zeigt die

Klonierungsstrategie sowie das Agarosegel der mit BamHI und EcoRI verdauten Midi und den Banden des nun kompletten ER^{TAM} bei 963 bp sowie 2330 bp für das Vektor-Rückgrat.

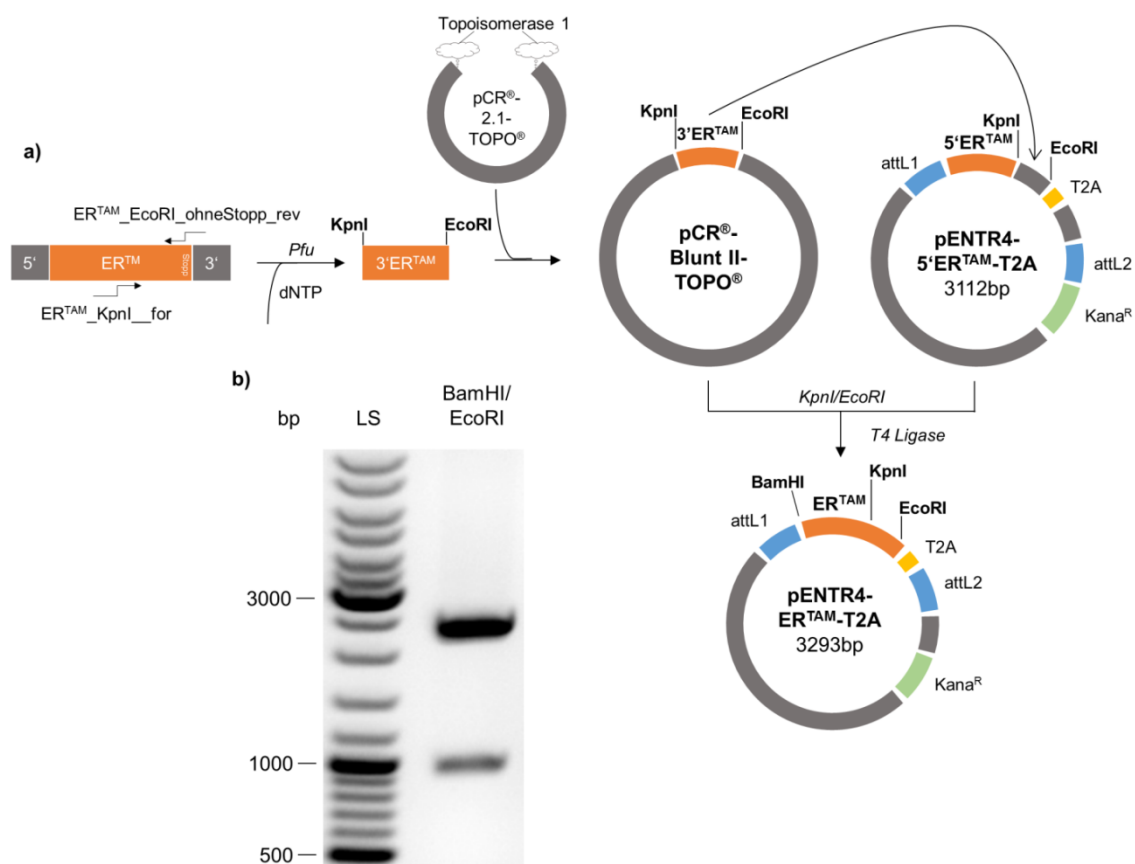


Abb. 5-3: Klonierung des 3'-Anteils des Östrogen-Rezeptors. In a) ist die Klonierungsstrategie gezeigt: Per PCR wurde 3'-ER^{TAM} unter Entfernung des Stoppcodons und Einfügen einer EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende amplifiziert, in einen TOPO-Vektor aufgenommen und mittels KpnI/EcoRI in das Zielplasmid ligiert. In b) ist das Agarosegel eines mit dem resultierenden Plasmid pENTR4-ER^{TAM}-T2A korrekt transformierten Klons mit den Banden 963 bp (ER^{TAM}) sowie 2330 bp (Vektor-Rückgrat) gezeigt. (LS=Längenstandard)

5.1.3 Klonierung der Gaussia Luziferase

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung der Gaussia Luziferase diente das Plasmid pCMV-GLuc (Targeting Systems). Basierend auf der cDNA-Sequenz von GLuc wurden Primer designet, an deren Enden für die spätere Umklonierung die Restriktionsstellen für NotI (5') bzw. XbaI (3') angehängt wurden (**Abb. 5-4a**). Mithilfe dieser Primer wurde in einer PCR mit *Taq*-Polymerase die Sequenz aus dem genannten Vektor amplifiziert, das PCR-Produkt gelelektrophoretisch isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde es wie oben beschrieben per TOPO-Klonierung in einen pCR 2.1-Vektor gebracht. Die korrekte Sequenz von GLuc wurde per Sequenzierung bestätigt. Im nächsten Schritt wurde GLuc mittels der Restriktionsenzyme NotI und XbaI aus dem pCR 2.1 Plasmid herausgeschnitten.

Ursprünglich sollte GLuc nun in das weiter oben beschriebene Plasmid pENTR4-ER^{TAM}-T2A hinter die T2A-Sequenz kloniert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass in der Sequenz von ER^{TAM} ebenfalls eine Schnittstelle für XbaI vorhanden ist, sodass GLuc stattdessen in einem ersten Schritt in das mit NotI und XbaI linearisierte Plasmid pENTR-T2A ligiert wurde. Nach Plasmidisolation aus Übernachtskulturen wurde per Restriktionsanalyse ein richtig transformierter Klon ausgewählt und eine Midi-Präparation angefertigt. **Abb. 5-4 b)** zeigt die erwarteten Banden von 2024 und 876 bp bei Verdau mit PvuI.

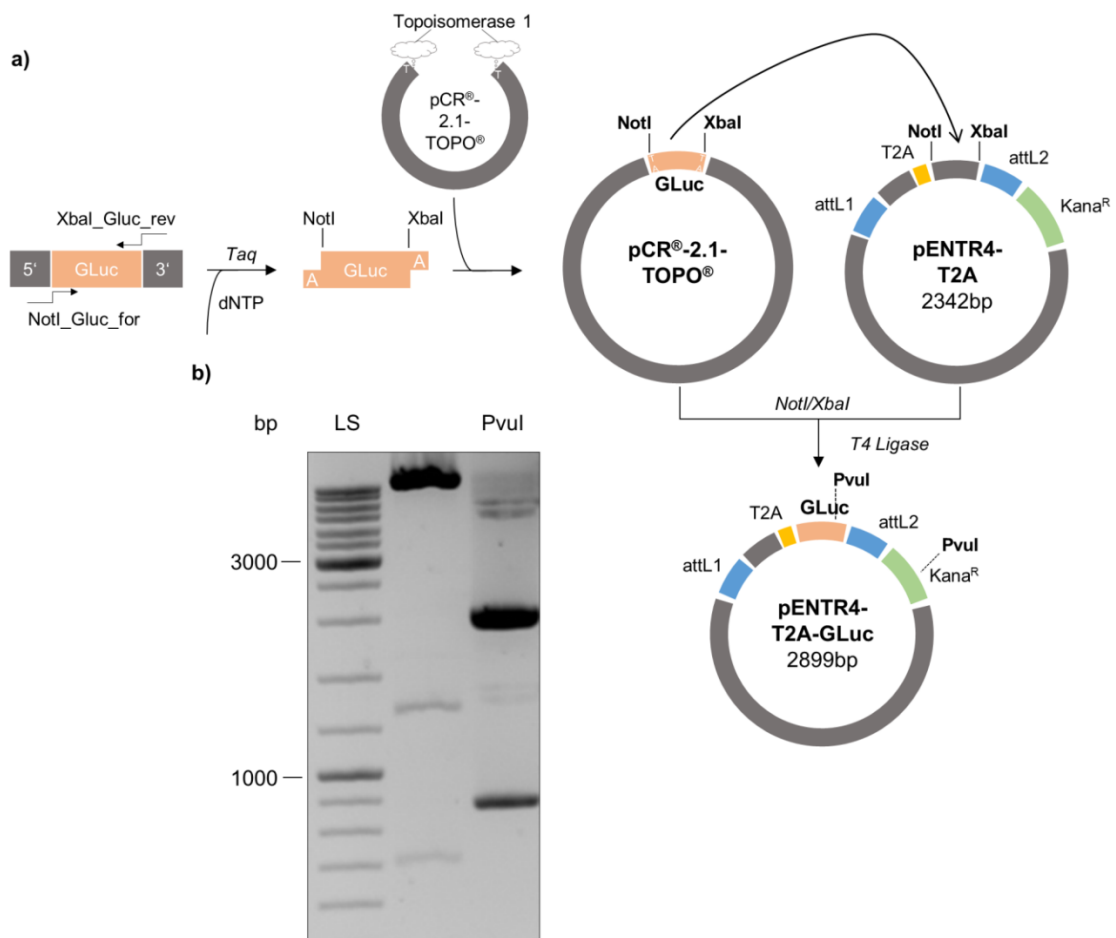


Abb. 5-4: Klonierung der Gaussia-Luziferase (GLuc). In a) ist die Klonierungsstrategie dargestellt: Die cDNA der Gaussia-Luziferase wurde per PCR unter Einfügen der benannten Schnittstellen amplifiziert, in einen TOPO-Vektor aufgenommen und dann per Restriktion/Ligation mit NotI und XbaI in den Zielvektor kloniert. In b) ist die Restriktionsanalyse einer Midi-Präparation des resultierenden Plasmids pENTR4-T2A-GLuc mit PvuI und den erwarteten Banden bei 2024 bp und 876 bp dargestellt.

ER^{TAM} wurde wegen der oben beschriebenen Problematik der zusätzlichen XbaI-Schnittstelle nun mittels BamHI und EcoRI aus pENTR4-ER^{TAM}-T2A isoliert und in das zuvor generierte Plasmid vor die T2A-GLuc Sequenz kloniert. Per Restriktionsanalyse mit BamHI und EcoRI wurde bestätigt, dass ER^{TAM} korrekt ligiert hatte: Es zeigten sich die

erwarteten Banden bei 964 bp sowie 2887 bp. **Abb. 5-5** zeigt die Klonierungsstrategie, das resultierende Plasmid und die beschriebenen Banden im Agarosegel.

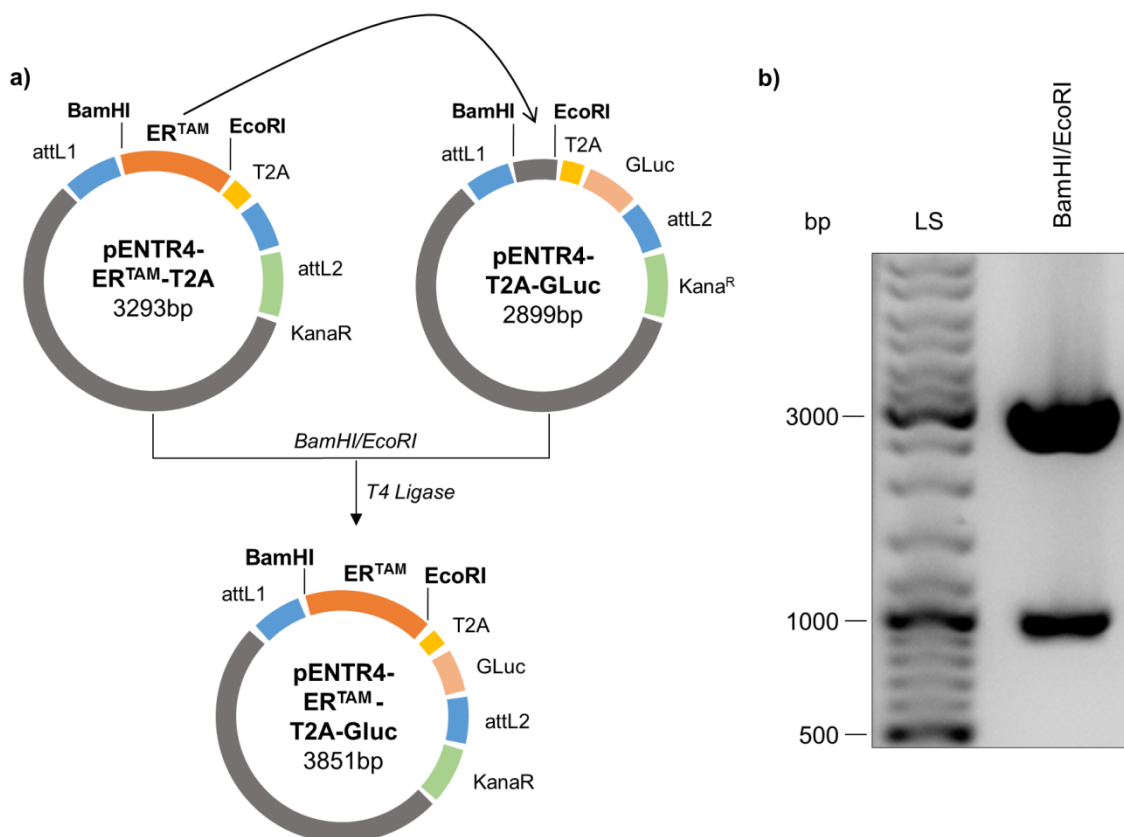


Abb. 5-5: Generierung des Plasmids pENTR4-ER^{TAM}-T2A-GLuc. In a) ist die Klonierungsstrategie gezeigt: ER^{TAM} wurde mittels BamHI und EcoRI in das zuvor generierte pENTR4-T2A-GLuc umklontiert. b) zeigt die Restriktionsanalyse einer Midi-Präparation des resultierenden Plasmids pENTR4-ER^{TAM}-T2A-GLuc mit BamHI und EcoRI und den erwarteten Banden bei 964 bp (ER^{TAM}) sowie 2887 bp (Vektor-Backbone).

5.1.4 Klonierung der p53 H1-Helix-Mutanten

Die verwendeten H1-Helix-Mutanten sollten das gesamte Kooperativitätsspektrum abdecken, d.h. von p53EE als inaktive Variante über RR, EL, WT bis zu RE, welche eine höhere Kooperativität aufweist als der Wildtyp. Analog zu den vorherigen Klonierungsschritten wurden zunächst Primer designt, um p53 aus vorhandenen Plasmiden zu amplifizieren. Um die gemeinsame Expression mit dem Östrogen-Rezeptor zu gewährleisten, musste auch hier das Stoppcodon entfernt werden sowie eine zusätzliche Base am 3'-Ende eingefügt werden, um das Leseraster zu erhalten. Zur späteren Subklonierung in den pENTR-Vektor wurden BamHI-Schnittstellen an das 5'- und 3'-Ende angefügt (**Abb. 5-6**).

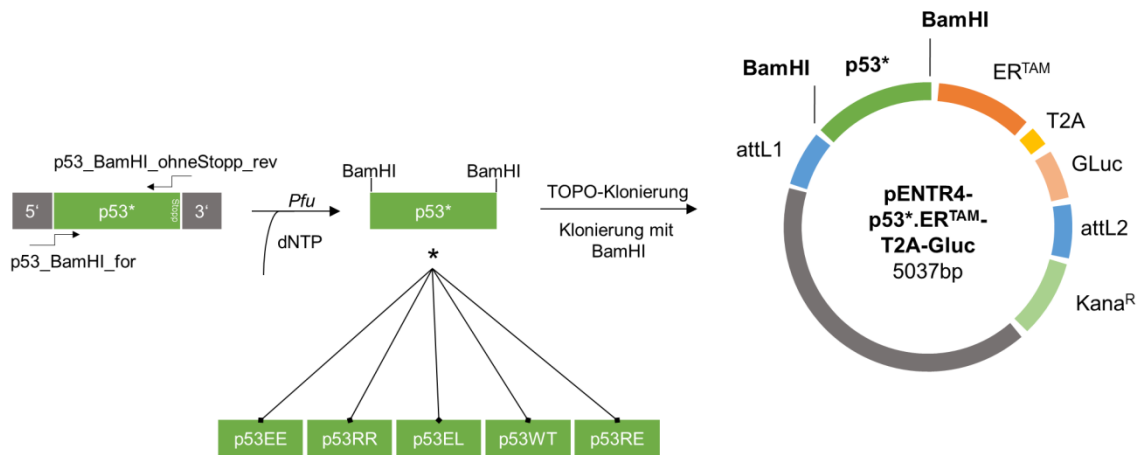


Abb. 5-6: Klonierung der p53 H1-Helix-Mutanten. Die verschiedenen Mutanten (p53*) wurden unter Entfernung des Stoppcodons und Einfügen von BamHI-Schnittstellen per PCR amplifiziert, in einen TOPO-Vektor aufgenommen und dann mittels BamHI in das pENTR4-ER^{TAM}-T2A-GLuc Plasmid kloniert.

Es erfolgte wiederum eine Ligation in einen TOPO-Vektor und eine Sequenzierung des aufgenommenen PCR-Produktes zur Bestätigung, dass im Verlauf der PCR keine Mutationen aufgetreten sind (nicht gezeigt). Der Zielvektor pENTR4-ER^{TAM}-T2A-GLuc wurde mit BamHI linearisiert und zeitgleich wurden, ebenfalls mit BamHI, jeweils parallel die verschiedenen p53-Kooperativitätsmutanten ausgeschnitten. Mit den im Folgenden angesetzten Ligationsansätzen wurden wiederum TOP10-elektrokompetente E.Coli transformiert, per Restriktionsanalyse passende Klone ausgewählt und in einer Midi-Präparation vervielfältigt. **Abb. 5-7** zeigt exemplarisch den Verdau der Midi mit dem Insert p53EE mit BamHI und den Banden bei 1186 bp (p53) und 3851 bp (Vektor-Rückgrat).

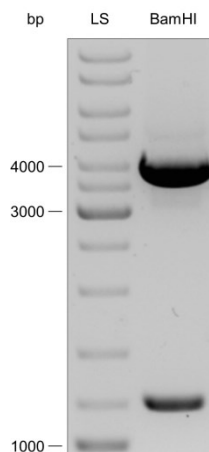


Abb. 5-7: Restriktionsanalyse von pENTR4-p53EE.ER^{TAM}-T2A-GLuc. 1µg DNA wurden mittels BamHI verdaut und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Zu sehen ist der Längenstandard (LS) und die Banden bei 1186 bp (p53) und 3851 bp (Vektor-Rückgrat)

5.2 Etablierung von isogenen, stabil exprimierenden Zelllinien

Mittels des cellular Genome Positioning Systems (cGPS) wurde der Versuch unternommen, Zelllinien zu etablieren, welche die in 5.1 beschriebenen, p53-H1-Helix-Mutanten tragenden Konstrukte stabil und isogen, d.h. auf gleichem Protein-Level exprimieren. Dies sollte eine optimale Vergleichbarkeit der Zelllinien und damit der verschiedenen Mutanten untereinander gewährleisten.

5.2.1 Generierung eines Gateway-Destination-Vektors

Wie in Kapitel 4.2.11 beschrieben, kann jeder beliebige Vektor über das Einfügen einer att-Rekombinationskassette in einen Gateway-Zielvektor (*Destination*-Vektor) konvertiert werden. Die Rekombinationskassette besteht aus den Attachment-Sites (attR1 und attR2), einem Chloramphenicol-Resistenz- sowie dem ccdB-Gen.

Hier wurde der Träger-Vektor des cGPS®-Systems (siehe Beschreibung unter 4.1.11) in einen Gateway-Destination-Vektor umgewandelt, um im nächsten Schritt die unter 5.1 beschriebenen Konstrukte transferieren zu können. Dazu wurde die cGPS-Integrationsmatrix pIM.Rag1.CMV.Neo mit dem Restriktionsenzym XhoI linearisiert und die entstehenden sticky ends mittels Pfu-Polymerase geglättet. Die Rekombinations-Kassette, welche ebenfalls über glatte DNA-Enden verfügt, wurde nun in einer Ligationsreaktion in den pIM-Vektor eingefügt (**Abb. 5-8a**). Mit dem Ligationsansatz wurden dann Bakterien, die das ccdA-Gen tragen, in diesem Fall OneShot ccdB Survival T1 (Life Technologies), transformiert und mittels der Chloramphenicol- und Ampicillin-Resistenz selektioniert. Per Restriktionsanalyse mit dem Enzym SmaI konnte ein Klon, der die Kassette in der richtigen Orientierung trägt, identifiziert werden. In **Abb. 5-8b** ist der Verdau mit den erwarteten Banden bei 9025 bp und 3301 bp gezeigt.

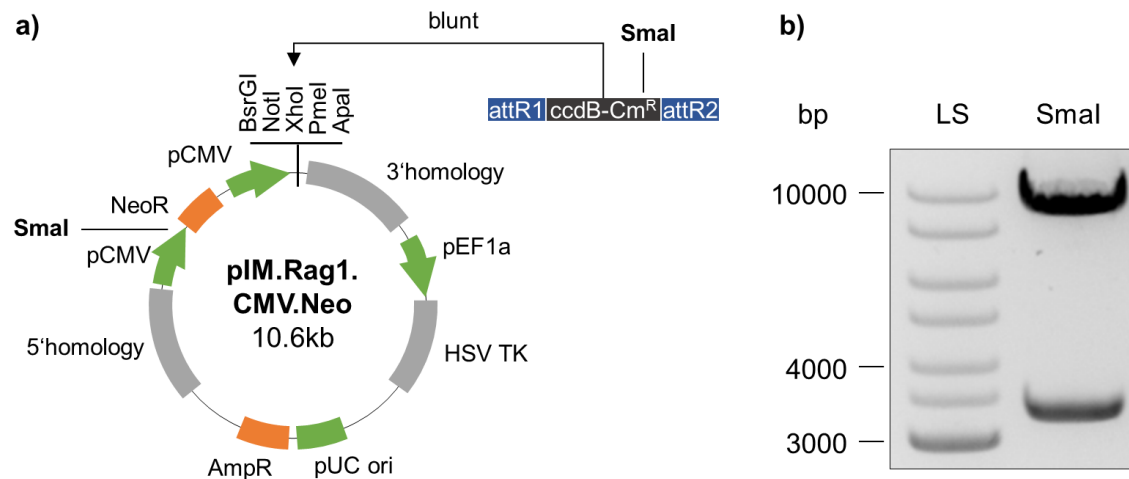


Abb. 5-8: Umwandlung der cGPS-Integrationsmatrix in einen Gateway-Destination-Vektor. a) Der Vektor wurde mit XhoI linearisiert, die Enden geglättet und die Rekombinationskassette eingebracht. b) zeigt den Verdau mit SmaI und den erwarteten Banden bei 9025 bp und 3301 bp. (LS=Längenstandard)

5.2.2 Klonierung der Expressionsvektoren

Mittels LR-Rekombinations-Reaktion (siehe Kapitel 4.2.11) wurden nun die p53.ER^{TAM}-T2A-GLuc Sequenzen von den pENTR-Plasmiden in den zuvor generierten Zielvektor (Gateway-Destination-Vektor) transferiert. **Abb. 5-9** zeigt schematisch den Ablauf der Reaktion. Mit dem Ansatz der LR-Reaktion wurden anschließend TOP10-elektrokompetente E.Coli (tragen kein ccdA-Gen) transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte über die Ampicillin-Resistenz sowie das Fehlen des ccdB-Gens. Nach Plasmidisolation aus Übernachtskulturen wurden per Restriktionsanalyse mit XbaI über die entstehenden Banden 6240 bp, 4732 bp, 1452 bp und 1058 bp korrekt transformierte Klone identifiziert. **Abb. 5-10** zeigt diese Banden nach Verdau der Midi-Präparationen im Agarosegel.

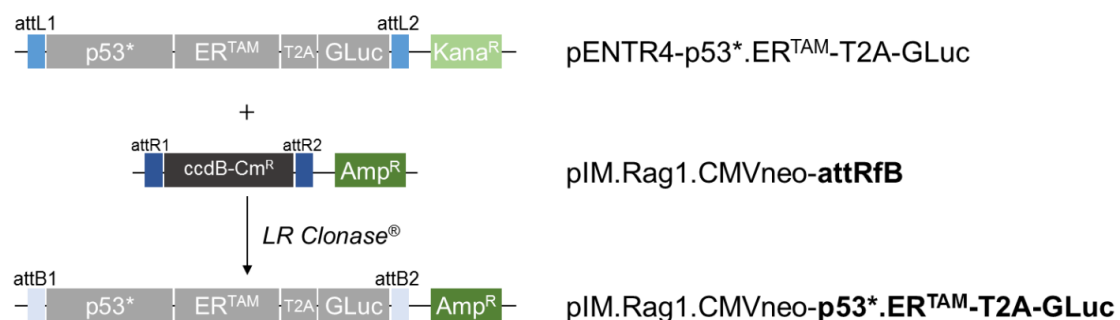


Abb. 5-9: Schema der LR-Reaktion. Über eine Rekombinationsreaktion zwischen den attL- und attR-Erkennungsstellen kommt es zum Austausch der Sequenz des pENTR-Plasmids mit der des Gateway-Destination-Vektors (pIM.Rag1-attRfB) und es entsteht ein neuer Vektor pIM.Rag1.CMVneo-p53*.ERTAM-T2A-GLuc sowie ein Nebenprodukt, welches das ccdB-Gen enthält.

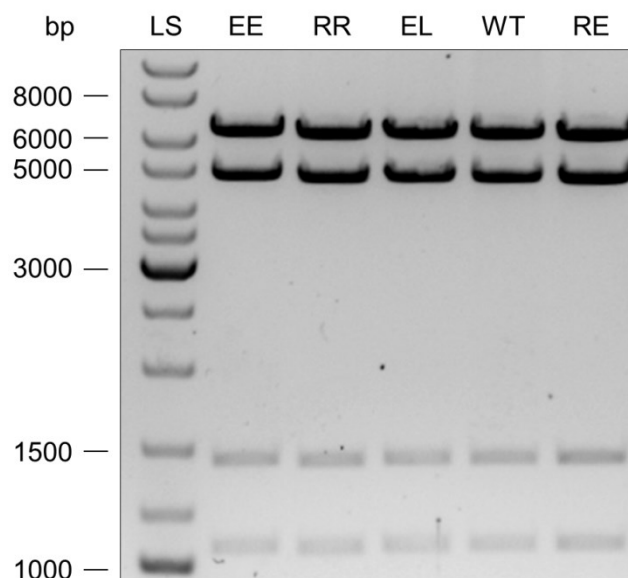


Abb. 5-10: Agarosegel der korrekt transformierten Klone nach LR-Reaktion. Je 1µg DNA wurden mittels XbaI verdaut und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Zu sehen sind der Längenstandard (LS) und die Banden der jeweiligen Klone bei 6240 bp, 4732 bp, 1452 bp, 1058 bp.

5.2.3 p53-ER^{TAM} wird in HEK293-Zellen exprimiert

Um die korrekte Expression von p53 und ER^{TAM} nachzuweisen, wurden HEK293-Zellen mit den zuvor generierten Expressionsplasmiden pIM.Rag1.CMV.neo-p53*.ER^{TAM}-T2A-GLuc bzw. einer GFP-Kontrolle transfiziert. Zur Transfektion wurden HEK293-Zellen 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät und mit je 7 µg des Expressionsplasmid sowie 1 µg GFP bzw. 7 µg Leervektor und 1 µg GFP in der Kontrolle transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Proteinexpression von p53 mittels eines p53-spezifischen Antikörpers sowie die des Östrogenrezeptors mittels eines ER-spezifischen Antikörpers nach gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht. Wie in **Abb. 5-11** dargestellt, zeigte sich eine korrekte Expression sowohl bei Detektion von p53 als auch von ER bei allen hier untersuchten Konstrukten. p53EL wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt kloniert und ist daher hier nicht dargestellt.

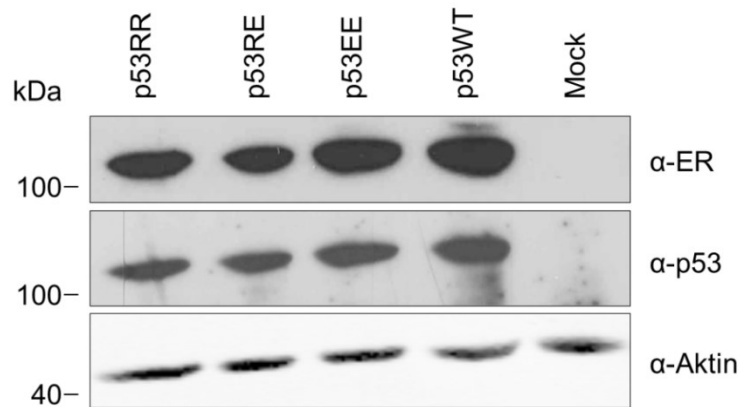


Abb. 5-11: p53-ER^{TAM} wird in HEK293-Zellen korrekt exprimiert. 48 Stunden nach transienter Transfektion mit den verschiedenen Expressionsplasmiden wurden die Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Je 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit einem p53-spezifischen bzw. einem ER-spezifischen Antikörper.

5.2.4 Gaussia Luziferase wird aus allen Konstrukten exprimiert

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass die Konstrukte korrekt translatiert werden und sowohl p53 als auch ER^{TAM} auf Proteinebene nachweisbar sind, soll nun gezeigt werden, dass die Gaussia Luziferase (GLuc) ebenfalls exprimiert und durch die T2A-Sequenz korrekt in ein einzelnes Protein abgespalten wird. Dazu wurden H1299 Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert, 24h später Medienüberstand entnommen und wie unter 4.4.5 beschrieben die Aktivität der Gaussia Luziferase gemessen. Es zeigte sich, dass GLuc aus allen Konstrukten auf vergleichbarem Niveau exprimiert wird (**Abb. 5-12**) und im Überstand messbar ist.

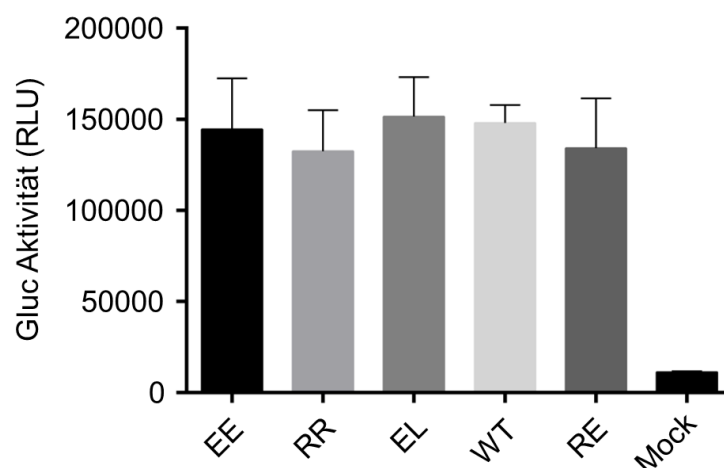


Abb. 5-12: Gaussia Luziferase wird aus allen Konstrukten exprimiert. H1299 Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und 24 Stunden später die Aktivität von GLuc im Medienüberstand gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 2 verschiedenen Ansätzen.

5.2.5 p53-ER^{TAM} aktiviert p53-spezifische Promotoren in Abhängigkeit der Stärke der Kooperativität

In den zwei vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass p53ER^{TAM} und GLuc aus allen Konstrukten korrekt exprimiert werden. Weiterhin war es wichtig zu wissen, ob die p53-ER^{TAM}-Fusionsproteine in der Lage sind, an typische p53-responsive Elemente (RE) zu binden und Zielgene zu aktivieren. Dazu wurden zwei in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Reportersysteme verwendet. Erstens, der p53-Konsensus-Reporter, bei dem ein perfektes p53-RE (p53-Konsensus Motiv: RRRCATGYYYRRRCATGYYY) *upstream* vor der Sequenz einer Firefly-Luziferase sitzt. Wann immer p53 daran bindet, wird das Luziferase-Gen exprimiert. Zweitens, der p53AIP1-Reporter, hier wurden die p53-responsiven Bereiche aus dem Promotor von p53AIP1 (p53AIP1 p53-responsives Element: TCTCTTGCCCGGGCTTGTCG) vor die Luziferase kloniert. p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) ist ein von p53 reguliertes Gen, welches als Mediator von p53-abhängiger Apoptose über den intrinsischen (Mitochondrien-vermittelten) Weg fungiert (Matsuda et al., 2002; Oda et al., 2000b).

H1299 Zellen wurden im 96-well Format mit insgesamt 200 ng DNA transfiziert: 50ng p53-Expressionsplasmid +/- 50ng Reporterplasmid und Ballast-DNA. 24h nach der Transfektion erfolgten ein Medienwechsel und die Zugabe von 4-OHT, um die p53-ER^{TAM}-Fusionsproteine zu aktivieren. Weitere 18h später erfolgte die Messung der Firefly- sowie Gaussia-Luziferase Aktivität, wobei zur Auswertung die Firefly- auf die Gaussia-Luziferase normalisiert wurde, um Unterschiede in der Menge der tatsächlich transfizierten DNA und damit der Expression der Konstrukte auszugleichen.

Die Aktivierung des p53-Konsensus Reporters erfolgte am stärksten durch den WT, gefolgt von RE und RR, wobei letztere den Reporter auf ähnlichem Niveau aktivieren konnten. Die aufgrund sehr schwacher DNA-Bindung fast inaktive Mutante EE konnte den Reporter hingegen kaum aktivieren (**Abb. 5-13**, schwarze Balken). Der p53AIP1-Reporter wurde am stärksten durch die Mutante RE angesprochen, gefolgt vom WT. Die Mutanten mit eingeschränkter Kooperativität, RR und EE konnten den Reporter hingegen gar nicht (EE) bzw. nur schwach (RR) aktivieren (**Abb. 5-13**, graue Balken). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bereits publizierten Daten aus der Arbeitsgruppe (Schlereth et al., 2010a): p53AIP1 als typisches, Apoptose auslösendes Zielgen von p53 besitzt ein vom Konsensus-Motiv stark abweichendes, weniger perfektes p53-responsives Element. Dieses wird bevorzugt von Mutanten mit hoher Kooperativität gebunden, was sich in den Ergebnissen widerspiegelt.

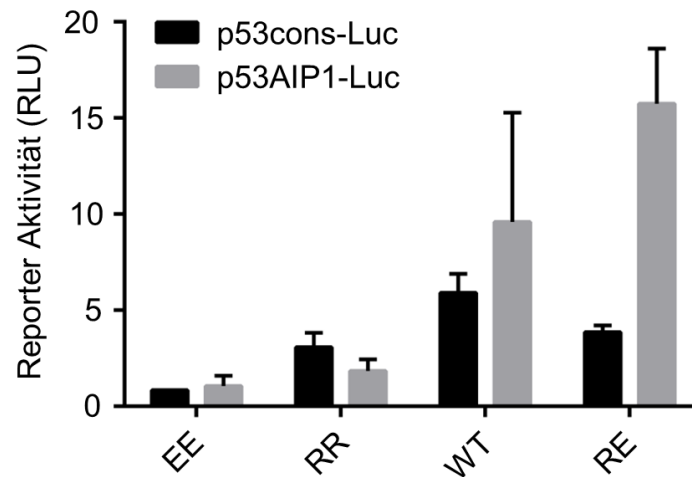


Abb. 5-13: Luziferase Reporter Assay. H1299 Zellen wurden mit den p53-Expressionsplasmiden sowie Luziferase-Reporterplasmiden für den p53-consensus Promotor und den p53AIP1 Promotor transfiziert. Die Firefly Reporter Aktivität wurde auf die Gaussia-Luziferase Aktivität normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD von zwei Replikaten nach Zugabe von 4-OHT zur Aktivierung von p53.

5.2.6 Selektion von Einzelklon-Zelllinien nach zielgerichteter Integration

Die zuvor getesteten Integrationsmatrizen pIM.Rag1.CMVneo-p53*.ER^{TAM}-T2A-GLuc wurden nun zusammen mit dem Meganuklease-Expressionsplasmid (Collectis) in H1299-CLuc Zellen transfiziert. Die hsRag1-Meganuklease (Collectis) hat eine 24 bp lange Erkennungssequenz im Rag1-Gen; nach Expression soll sie an die Sequenz binden und einen Doppelstrangbruch induzieren. In den jeweils co-transfizierten Integrationsmatrizen flankieren zum Rag1-Gen homologe Sequenzen die p53-Konstrukte. Diese homologen Regionen sollen als Matrize für eine DNA Reparatur durch homologe Rekombination dienen (detaillierte Beschreibung unter 4.1.11).

Hierzu wurden je 200.000 Zellen je well am Vortag der Transfektion in eine 6-well Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit je 2,4 μ g Meganuklease-Expressionsplasmid sowie 1,6 μ g Integrationsplasmid pro well. Nach drei Tagen wurden die Zellen auf 10 cm Platten in verschiedenen Dichten neu ausgesät, um das spätere Picken von Einzelzellklonen zu erlauben. Ab Tag vier wurde sieben Tage mit 0,4mg/ml G418 selektioniert, von Tag 11-20 zusätzlich mit 30 μ M Ganciclovir. An Tag 21 wurden Einzelzellklone unter dem Mikroskop gepickt und in 96-well Platten überführt. Nach einigen Tagen wurden die Klone in eine weitere 96-well Platte dupliziert, welche im Weiteren zur Gewinnung von genomischer DNA benutzt wurde.

5.2.7 PCR zur Identifizierung zielgerichteter Integration

Von jedem Genotyp wurden ~ 50 Klone gepickt. Mittels einer PCR (siehe 4.1.11.2) sollten nun Klone identifiziert werden, welche die Konstrukte per homologer Rekombination in den Rag1-Genloкус aufgenommen haben.

Zum vereinfachten Screening wurden zunächst jeweils mehrere DNA-Proben in einem Ansatz gesammelt untersucht und bei positiver PCR jeweils weiter unterteilt. Nach Abschluss des Screenings konnten insgesamt fünf positive Klone identifiziert werden: Einen WT-Klon sowie je zwei RR- und RE-Klone. Ein Teil der p53 cDNA, der die H1-Helix Region mit einschließt, wurde per PCR amplifiziert und zur Validierung der vorliegenden H1-Helix-Mutation sequenziert (Daten nicht gezeigt). Die so identifizierten Klone werden im Folgenden als **HR⁺** (Homologe Rekombination positiv) bezeichnet.

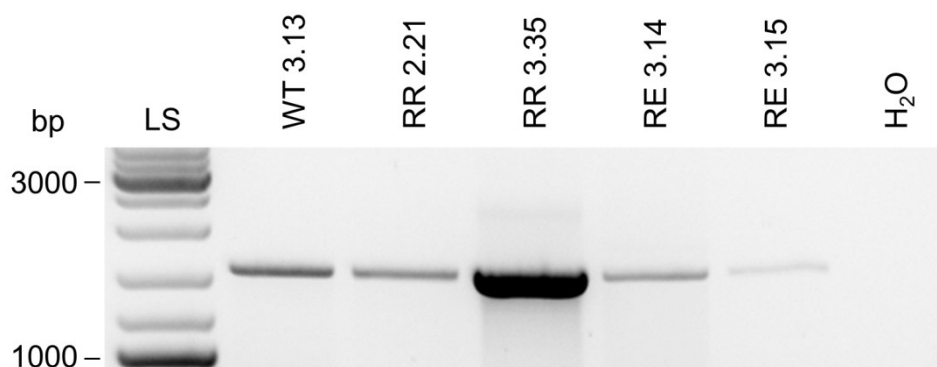


Abb. 5-14: Validierungs-PCR zur Identifizierung von HR⁺ Klonen. Pro Genotyp wurden ~ 50 Klone auf Integration der Konstrukte durch homologe Rekombination untersucht. Diese fünf Klone waren durch die erwartete Bande als positiv befunden worden und wurden in dieser PCR nochmals validiert.

5.2.8 HR⁺ Zelllinien weisen unterschiedliche Proteinlevel von p53 auf

Trotz des Screenings von zahlreichen Klonen auf erfolgreiche Integration konnte nicht von jeder gewünschten H1-Helix-Mutation ein positiver Klon gefunden werden. Aus diesem Grund wurden mit dem Ziel, das ganze Spektrum der Kooperativität für weitere Analysen abdecken zu können, für die weitere Charakterisierung der Zelllinien auch solche mitgeführt, die sich in der PCR nicht als zielgerichtet integriert gezeigt haben.

Bei den Zelllinien, die in der PCR positiv auf zielgerichtete Integration getestet wurden (HR⁺) handelt es sich in der Theorie um isogene Zellklone, da in jeder Zelle nur eine Kopie des Konstruktes integriert haben sollte. Zellen, die weitere Kopien zufällig integriert haben, sollten durch die Gegenselektion mit Ganciclovir eliminiert worden sein. Um dies zu verifizieren, wurden die Klone expandiert und ein Western Blot zur Detektion der p53-Protein-Level durchgeführt. Gleichzeitig sollten HR-negative Klone gefunden werden, die auf einem ähnlichen Niveau exprimieren, um die ganze Bandbreite an H1-Helix-Mutationen für weitere Untersuchungen abzudecken.

Bei relativ gleichmäßiger Aktin-Expression als Ladekontrolle zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression von p53. Die HR+ Klone weisen dabei eine besonders starke Bandbreite auf: So zeigt der Klon WT 3.13 eine sehr niedrige Expression von p53, während der Klon RE 3.14 ein vielfach höheres Proteinlevel aufweist. Die beiden RR – Klone 2.21 und 3.35 stehen dabei ungefähr in der Mitte dieser Varianz und exprimieren, wenn man die etwas niedrigere Aktin-Expression von 3.35 beachtet, p53 ungefähr auf dem gleichen Niveau. Auch die HR-negativen Klone weisen deutliche Unterschiede auf. Zwar sind EE 2.12 und WT 2.10 auf ungefähr dem gleichen Niveau, jedoch konnte z.B. bei der Zelllinie 2.16 mit der EL Mutante gar kein p53 detektiert werden. Insgesamt war eine lange Expositionszeit notwendig, um die gezeigten Ergebnisse zu realisieren. GLuc 2.12 (mit dem Konstrukt T2A-GLuc) fungierte bei diesem Experiment als Negativkontrolle. Die Ergebnisse des Western Blots sind in **Abb. 5-15** dargestellt.

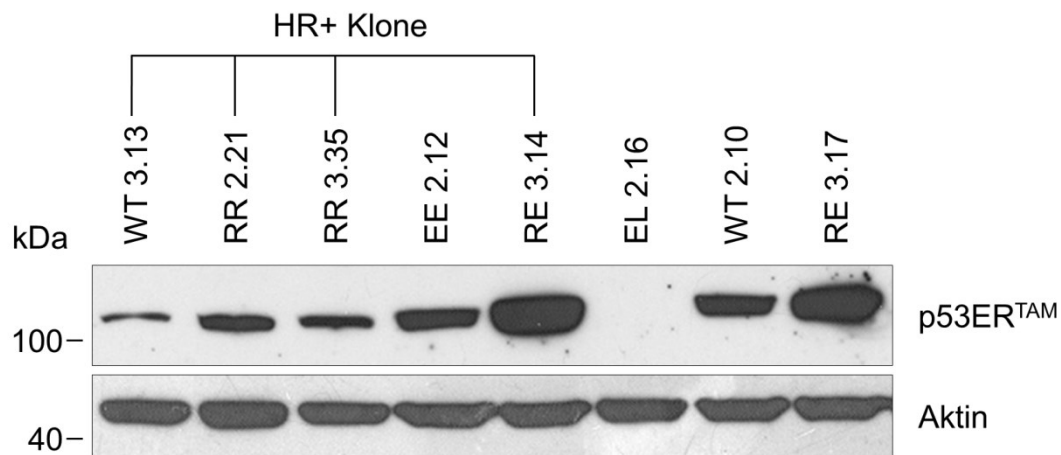


Abb. 5-15: HR+-Zelllinien weisen unterschiedliche p53-Proteinlevel auf. Zellen der angegebenen Zelllinien wurden geerntet, lysiert und anschließend je 50 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem p53-spezifischen Antikörper.

5.2.9 HR+ Zelllinien sind nicht in der Lage, p21^{CDKN1A} als typisches p53 Zielgen zu aktivieren

Die nächste Frage war, ob die HR+ Klone, obwohl sie offensichtlich keine Isogenität bezüglich der integrierten Konstrukte aufweisen, zumindest ein ausreichendes Proteinlevel an p53 aufweisen, um p21 als typisches Zielgen von p53 zu aktivieren.

Hierzu wurde RE 3.14 als Klon mit der stärksten Expression des p53-Konstruktes einer Behandlung mit 4-Hydrotamoxifen (4-OHT, zur Aktivierung von p53) und/oder Doxorubicin als DNA-schädigendes Agens unterzogen. Unter anderem interkaliert Doxorubicin in die DNA, führt zu Doppelstrangbrüchen, stabilisiert den Topoisomerase II-DNA-Komplex und inhibiert damit die Replikation (Tacar et al., 2013; Tewey et al.,

1984). Diese Mechanismen führen, besonders in Tumorzellen, zur Stabilisierung von p53 und zur Auslösung von Apoptose (Wang et al., 2004).

Für den Versuch wurden Zellen am Vortag auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät, für 24 Stunden behandelt und dann geerntet. Die Zellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann ein Immunoblot auf p53 und p21^{CDKN1A} als typisches Zielgen für Zellzyklusarrest durchgeführt. Um das Expressionsniveau von p53 besser beurteilen zu können, wurden HCT 116 p53^{+/+} Zellen als Positivkontrolle für die Höhe der endogenen p53 Proteinlevel mitgeführt.

Bezüglich der Expression von p53 fällt in **Abb. 5-16** auf, dass das basale Level in den HR+ H1299-Zellen, also ohne Doxorubicin und Tamoxifen, deutlich niedriger ist als das basale Level von endogenem p53 in HCT 116 Zellen. Der RE-Klon lässt allenfalls eine minimale Induktion von p21 durch 4-OHT ± Doxorubicin erkennen. Insbesondere im Vergleich mit der verstärkten Expression von p21 durch Nutlin-3 in den HCT 116 Zellen zeigt sich die Induktion jedoch als sehr schwach. Zwar ist bekannt, dass p53 RE als hochkooperatives p53 p21 weniger stark induzieren kann, als der WT (Schlereth et al., 2010a), gleichwohl wäre hier bei ausreichender Expression von p53 eine stärkere Bande zu erwarten gewesen. In einer quantitativen PCR zeigte sich, dass der Klon WT 3.13 p21 auf mRNA Ebene ebenfalls nicht induzieren konnte (Daten nicht gezeigt).

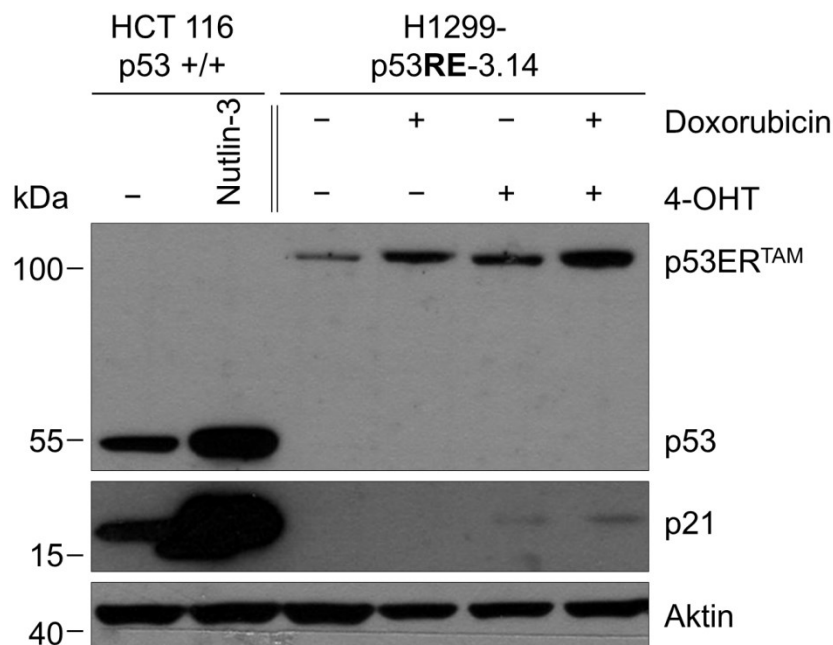


Abb. 5-16: HR+ Klone können p21 nicht aktivieren. Die angegebenen HR+ Zelllinien wurden für 24 Stunden der angegebenen Behandlung mit Doxorubicin und/oder Tamoxifen unterzogen. Aus den danach geernteten Zellen wurden Lysate hergestellt und je 50 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem p53- bzw. p21-spezifischen Antikörper.

5.2.10 Die H1-Helix-Mutationen zeigen in den HR+ Zelllinien keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Auf Proteinebene konnte also festgestellt werden, dass der Klon RE 3.14, und damit wohl alle HR+ Zelllinien, p21, ein typisches Zielgen von p53, nicht induzieren konnten. Als nächstes sollte geprüft werden, ob bei einer Untersuchung der Zellviabilität nach Behandlung mit 4-OHT \pm Doxorubicin zwischen Kontrollzellen ohne p53 und Zellen mit restituiertem p53 trotzdem Unterschiede messbar sind. Dafür wurden Zellen der getesteten Zelllinien im 96-well Format ausgesät und für 24 bzw. 48 Stunden der entsprechenden Behandlung unterzogen. Anschließend wurde mithilfe des Cell Titer Glo[®] Assay (Promega, s. 4.1.8) die Lumineszenz als Maß für den ATP-Gehalt und damit der Zahl der lebensfähigen Zellen gemessen. Wäre die Expression von p53 in den Zelllinien stark genug, sollten die p53 WT und RE Klone eine deutliche Abnahme der lebenden Zellen zumindest bei gleichzeitiger Behandlung mit 4-OHT und Doxorubicin als DNA-schädigendes Agens aufweisen, während die RR-Zelllinie aufgrund der relativen Unfähigkeit der Mutante, Apoptose auszulösen, eine deutlich weniger starke Abnahme der Lebendzellzahl zeigen sollte.

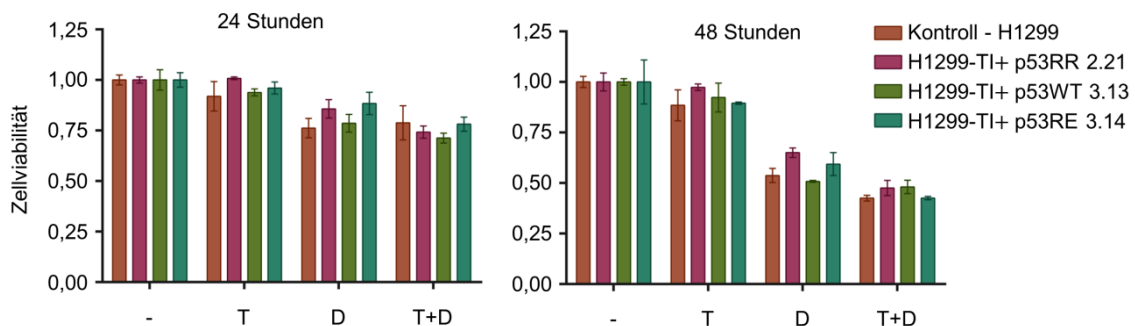


Abb. 5-17: HR+Zellen zeigen keine Unterschiede in der Zellviabilität bei Behandlung mit 4-OHT \pm Doxorubicin. Zellen wurden im 96-well Format ausgesät, mit 4-OHT (T) und/oder 0,25 μ g/ml Doxorubicin (D) für 24 bzw. 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter Glo (Promega) gemessen und die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD aus jeweils 3 Replikaten.

Weder nach 24 noch nach 48 Stunden sind in der nur mit 4-OHT behandelten Gruppe Änderungen in der Lebendzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle feststellbar. In der mit Doxorubicin alleine behandelten Gruppe kommt es nach 24 Stunden, besonders aber nach 48 Stunden bereits zu einem starken Abfall der Viabilität, also offensichtlich zu p53-unabhängiger Apoptose. Diese wird vermutlich über reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst (Tsang et al., 2003). In der Gruppe, in der p53 durch 4-OHT aktiviert wurde und zusätzlich mit Doxorubicin behandelt wurde, ist besonders nach 48 Stunden eine weitere Abnahme der Viabilität im Vergleich zu Doxorubicin alleine sichtbar.

Allerdings betrifft dieser Effekt auch die Kontrollzellen und es ist vor allem auch kein Unterschied zwischen den verschiedenen H1-Helix-Mutanten ersichtlich.

Zusammengenommen erwies sich dieses Modell als nicht erfolgreich. Es wies weder eine induzierbare und effektive Aktivität noch eine gleichmäßige Expression von p53 auf; dies sind jedoch zwei Grundvoraussetzungen zur Tauglichkeit als Modell zur Untersuchung der Kooperativität. Als Konsequenz darauf zeigte sich logischerweise, dass der Status der H1-Helix Mutationen hier keinen Einfluss auf das Zellschicksal hatte.

5.3 Etablierung eines NSCLC-Zellkulturmodells zur Untersuchung der p53 DNA Bindungskooperativität

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass es nicht möglich war, mithilfe des cGPS-Systems isogene Zellklone zu erzeugen, welche die p53-Konstrukte in gleicher Stärke exprimieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression insgesamt zu niedrig war, um einen Einfluss der Kooperativität auf das Zellschicksal auszulösen.

Der nächste Schritt war daher, die Konstrukte in einen Vektor mit starkem Promotor zu klonieren und damit neue Zelllinien zu generieren, mit denen der Einfluss der p53 DNA Bindungskooperativität auf Zellschicksalsentscheidungen untersucht werden kann.

5.3.1 Generierung eines neuen Expressionsvektors

Als Ausgangsvektor diente ein mit einer Gateway-Rekombinationskassette versehenes pCMVneo-Bam Plasmid (Baker et al., 1990), ein eukaryotischer Expressionsvektor mit Promotor-Enhancer-Sequenzen aus dem humanen Cytomegalievirus. Dieser wurde für eine Gateway-Rekombinations-(LR-)Reaktion mit den unter 5.1 beschriebenen pENTR4-Vektoren mit den p53-ER^{TAM}-T2A-GLuc Konstrukten verwendet. Eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zeigt **Abb. 5-18**.

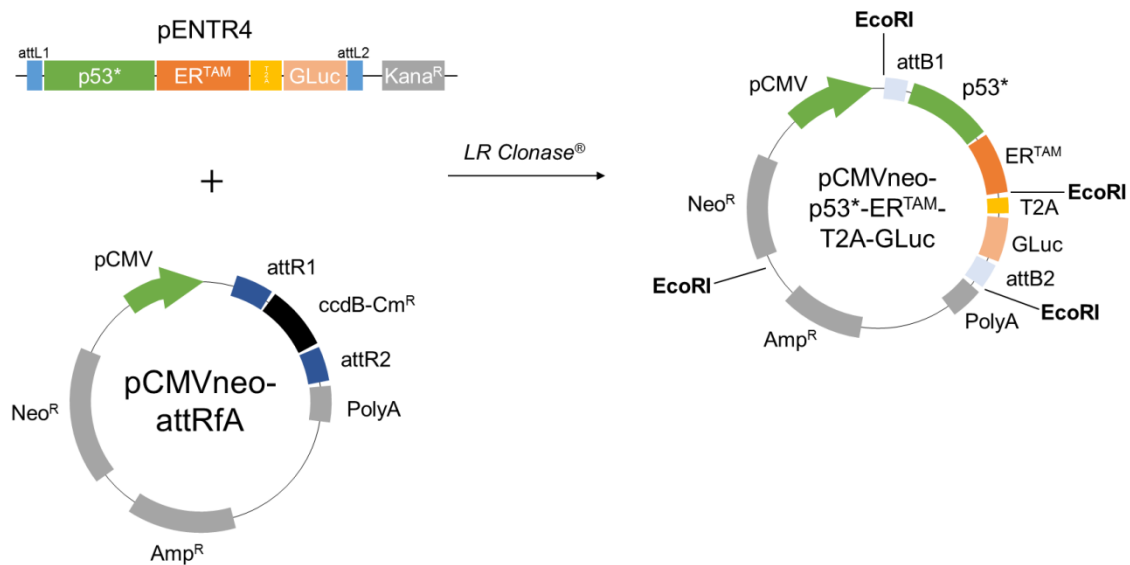


Abb. 5-18: Schema der Klonierung des Vektor pCMVneo-p53-ER^{TAM}-T2A-GLuc. Die p53-Konstrukte aus den pENTR4-Plasmiden wurden mittels einer LR-Reaktion in das Plasmid pCMVneo (Vogelstein) mit Rekombinationskassette (attRfA) gebracht. Markiert sind die EcoRI-Schnittstellen, die für die Restriktionsanalyse des resultierenden Plasmids genutzt wurden. p53* = Set der verschiedenen H1-Helix-Mutanten: EE, RR, EL, WT, RE.

Mit dem Ansatz der LR-Reaktion wurden TOP10-elektrokompetente E.Coli (tragen kein ccdA-Gen) transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte über die Ampicillin-Resistenz sowie das Fehlen des ccdB-Gens. Nach Plasmidisolation wurden per Restriktionsanalyse mit EcoRI korrekt transformierte Klone ausgewählt, diese nochmal vervielfältigt und per Midi-Präparation die Plasmide isoliert. **Abb. 5-19** zeigt das Agarosegel der Midi-Präparationen nach Verdau mit EcoRI und die erwarteten Banden bei 3625 bp, 2856 bp, 2283 bp, 730 bp für die Plasmide, welche das komplette Konstrukt tragen. Zusätzlich wurde nun ein Kontrollvektor kloniert, der kein p53 trägt: ER^{TAM}-T2A-GLuc mit den erwarteten Banden bei 3625 bp, 2856 bp, 1104 bp und 730 bp. Als Kontrolle wurde das Ausgangsplasmid pCMVneo-attRfA ebenfalls mit EcoRI verdaut und zeigte die Banden 3625 bp, 2856 bp, 1262 bp und 455 bp.

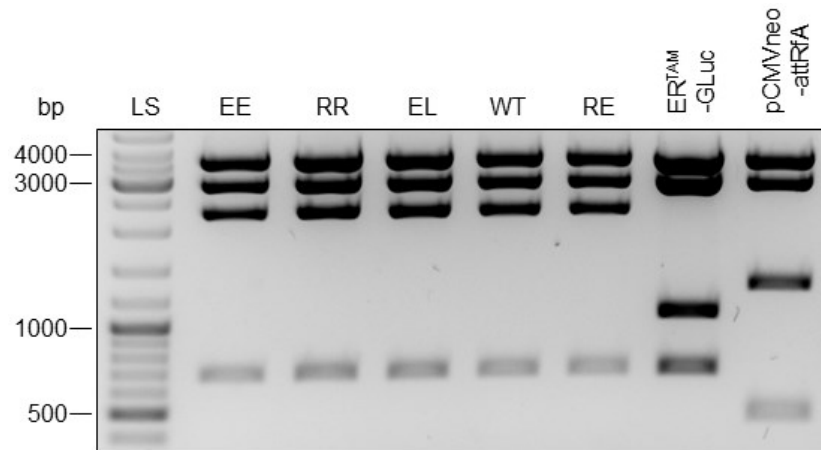


Abb. 5-19: Agarosegel nach Verdau der isolierten Plasmide mit EcoRI. Die Plasmide, welche das ganze Konstrukt p53-ER^{TAM}-T2A-GLuc tragen, zeigen Banden bei 3625 bp, 2856 bp, 2283 bp, 730 bp. Das Plasmid ohne p53, ER^{TAM}-GLuc, zeigt Banden bei 3625 bp, 2856 bp, 1104 bp, 730 bp. Als Kontrolle diente das Ausgangsplasmid pCMVneo-attRfA mit den Banden bei 3625 bp, 2856 bp, 1262 bp und 455 bp.

Im Abschnitt 5.2.2 wurde bereits gezeigt, dass die Konstrukte exprimiert werden und das mit 4-Hydroxytamoxifen aktivierte p53ER^{TAM} in der Lage ist, an p53-responsive Elemente zu binden. Um die neuen Expressionsvektoren zu testen, wurde daher nur nochmals die Expression von p53 48 Stunden nach transienter Transfektion von H1299 Zellen untersucht. Es wurde hierbei das gleiche Procedere angewendet, wie unter 5.2.3 beschrieben. Es zeigte sich, dass in allen Ansätzen p53 auf Proteinebene nachweisbar ist und es bei transienter Transfektion zu einer Überexpression im Vergleich zu dem Level von endogenem p53 aus den als Kontrolle mitaufgetragenen HCT 116 Zellextrakten kommt.

Abb. 5-20 zeigt die Ergebnisse des Western Blot.

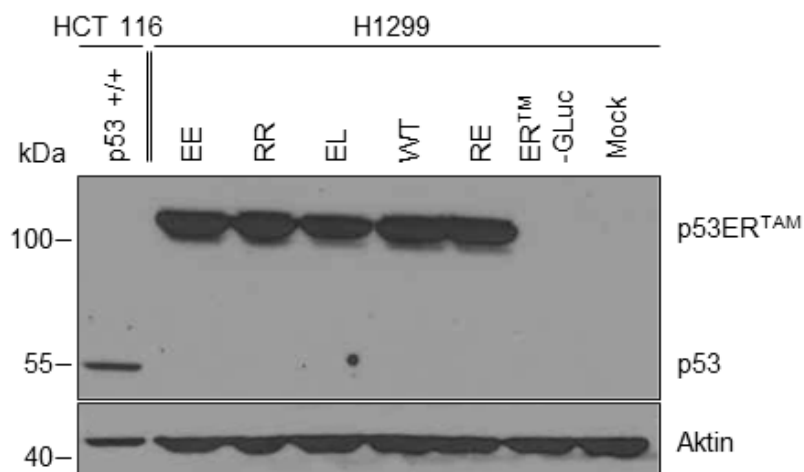


Abb. 5-20: Western Blot zur Kontrolle der Expression von p53. 48 Stunden nach transienter Transfektion mit den verschiedenen pCMVneo-Plasmiden wurden die Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Je 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit einem p53-spezifischen Antikörper.

5.3.2 Markierung von H1299-Zellen mit einer Cypridina Luziferase

Um die Zellzahl in Zellkultur oder das Tumorwachstum in eventuellen späteren Xenograft-Studien leicht überwachen zu können, wurden H1299 Zellen mit einem in der AG vorhandenen, für eine Cypridina Luziferase (CLuc) kodierenden Lentivirus infiziert, mittels Puromycin selektioniert und ein stark exprimierender Klon für die weitere Verwendung ausgewählt (Daten nicht gezeigt). CLuc ist wie GLuc eine natürlicherweise sekretierte und damit im Medienüberstand in Zellkultur oder im Plasma von Versuchstieren messbare Luziferase. Sie korreliert mit der Zellzahl und dem Tumorwachstum (Charles et al., 2014; Nakajima et al., 2004).

5.3.3 Herstellung monoklonaler Zelllinien

Um Zelllinien herzustellen, welche stabil die Konstrukte mit dem ganzen Spektrum der H1-Helix-Mutanten exprimieren, wurden nun H1299-CLuc Zellen mit den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Plasmiden transfiziert. Vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen passagiert und dünn (je 7500 Zellen) auf 15 cm Schalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte jetzt in der Gegenwart von 800 µg/ml Geneticin (G418), um Zellen zu selektionieren, welche das Plasmid und damit auch das Neomycin/Geneticin-Resistenzgen stabil integriert haben. 21 Tage später wurden Einzelzellkolonien gepickt, auf 96-well Platten transferiert und die Konzentration von G418 auf 300 µg/ml reduziert. Insgesamt wurden circa 40 Klone eines jeden Genotyps weiter kultiviert.

Zur Auswahl von Klonen, welche die Konstrukte möglichst stark (auf einem deutlich höherem Level als die cGPS/HR+ Klone) exprimieren, wurden die Zellen auf eine weitere 96-well Platte passagiert und die Aktivität der Gaussia-Luziferase im Medienüberstand einer jeden monoklonalen Zelllinie gemessen. Um die möglicherweise unterschiedliche Zellzahl pro well mit zu berücksichtigen, wurde zusätzlich ein Cell Titer Glo Assay durchgeführt (dieser korreliert sehr gut mit der Zellzahl (Petty et al., 1995)) und die Lumineszenz des Gaussia Assay auf die des Cell Titer normalisiert. In **Abb. 5-21** sind die jeweils stärksten sechs Klone gezeigt, die bei diesem Versuch gefunden worden.

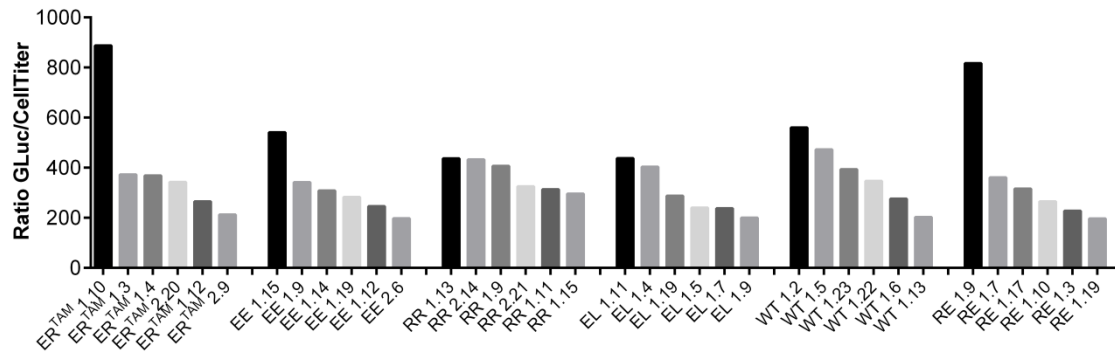


Abb. 5-21: Auswahl von Klonen. Zellen wurden auf 96-well ausgesät und jeweils die Aktivität der Gaussia-Luziferase im Medienüberstand gemessen. Um unterschiedliche Zellzahlen auszugleichen, wurde auch ein Cell Titer Glo Assay durchgeführt und damit die Gaussia-Aktivität auf die Zellzahl normalisiert. Dargestellt sind die jeweils sechs stärksten Klone eines jeden Genotyps.

Für die weiteren Versuche wurden jeweils die am stärksten exprimierenden Klone ausgewählt, außer im Falle ER^{TAM}, hier wurde Klon 1.3 gewählt, und RE, hier wurde Klon 1.7 gewählt. Wenn im Folgenden von Zellen die Rede ist, sind die hier beschriebenen Klone gemeint. Des Weiteren ist, wenn nur das Kürzel für die H1-Helix-Mutation (z.B. RR, EL etc.) genannt ist, immer die entsprechende Zelllinie mit dem gesamten Konstrukt p53-ER^{TAM}-T2A-GLuc gemeint. Die Klone wurden daraufhin nochmals in einem Western Blot validiert (**Abb. 5-22**).

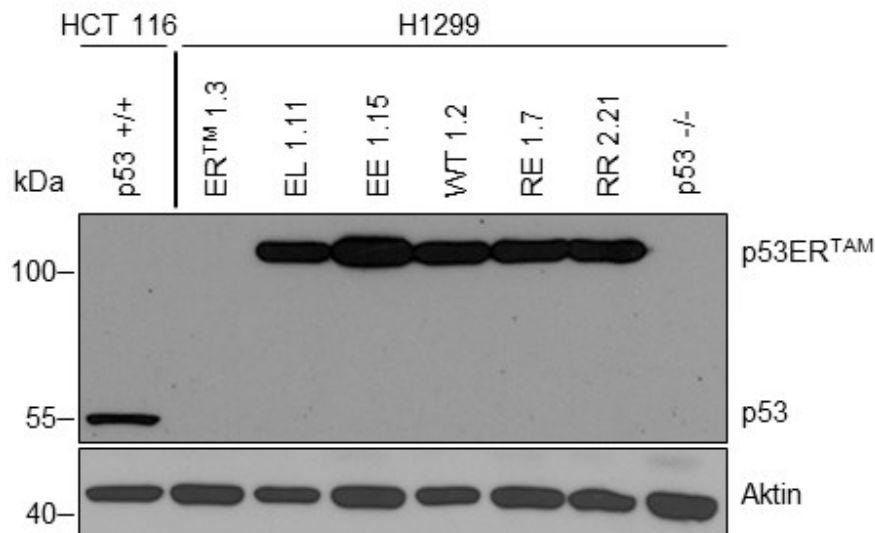


Abb. 5-22: Western Blot zur Validierung der ausgewählten Klone. Je 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit einem p53-spezifischen Antikörper.

5.3.4 Die Aktivierung von p53 verändert die Zellviabilität

Um die Funktionalität der neuen Zelllinien zu testen, wurde analog zu 5.2.10 die Zellviabilität untersucht. Zudem sollte untersucht werden, welche Doxorubicin-Konzentration am geeignetsten ist, Unterschiede zwischen den H1-Helix-Mutanten zu betonen und daher in Folgeversuchen verwendet werden kann. Dafür wurden Zellen im 96-well Format ausgesät, mit Doxorubicin in aufsteigenden Konzentrationen \pm 4-OHT behandelt und nach 24 Stunden die Lumineszenz als Maß für Zellviabilität mithilfe eines Cell Titer Glo[®] (Promega) Assay gemessen.

An den als Kontrollzellen eingesetzten H1299-ER^{TAM} ist zu erkennen, dass die Zellviabilität mit aufsteigenden Konzentrationen von Doxorubicin unabhängig von der Gabe von 4-OHT abnimmt, wobei der stärkste Abfall bei den Konzentrationen 0,25 µg/ml bis 1 µg/ml zu beobachten ist. H1299-p53EE und p53RR Zellen zeigen eine ganz ähnliche Reaktion auf Aktivierung von p53 und DNA-Schädigung mit Doxorubicin wie die Kontrollzellen, da sie als Mutanten mit geringer Kooperativität nicht in der Lage sind, proapoptotische Zielgene zu aktivieren (Schlereth et al., 2010a). Die Aktivierung von p53 zeigt daher auch unter zusätzlichem DNA-Schaden keinen von der Kontrolle abweichenden Effekt - vermutlich auch, weil es sich hier um einen kurzen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden handelt, in dem sich ein Zellzyklusstopp auf die Anzahl der Zellen kaum auswirken kann. Die Aktivierung von p53-EL, -WT und -RE zeigt hingegen deutlich stärkere Auswirkungen: Bereits ohne zusätzlichen DNA-Schaden durch Doxorubicin zeigen die EL-Zellen einen Abfall der Viabilität noch stärker die mit RE restituierten und am deutlichsten die WT-Zellen. Prägnanter wird der Unterschied zwischen aktiviertem und nicht-aktiviertem p53 bei steigenden Doxorubicin Konzentrationen, wobei der größte Unterschied bei EL, WT und RE bei c(Dox)=0,25 µg/ml auszumachen ist. Dies bedeutet einerseits, dass im Gegensatz zu den cGPS/HR+ Zelllinien die Expression von p53 stark genug zu sein scheint, um p53-spezifische Effekte in Abhängigkeit von der Kooperativität auszulösen. Des Weiteren stellte sich, um den Effekt der H1-Helix-Mutationen in diesem Kontext zu verstärken, eine Konzentration von 0,25 µg/ml Doxorubicin als optimal heraus und wurde daher in den weiteren Versuchen verwendet.

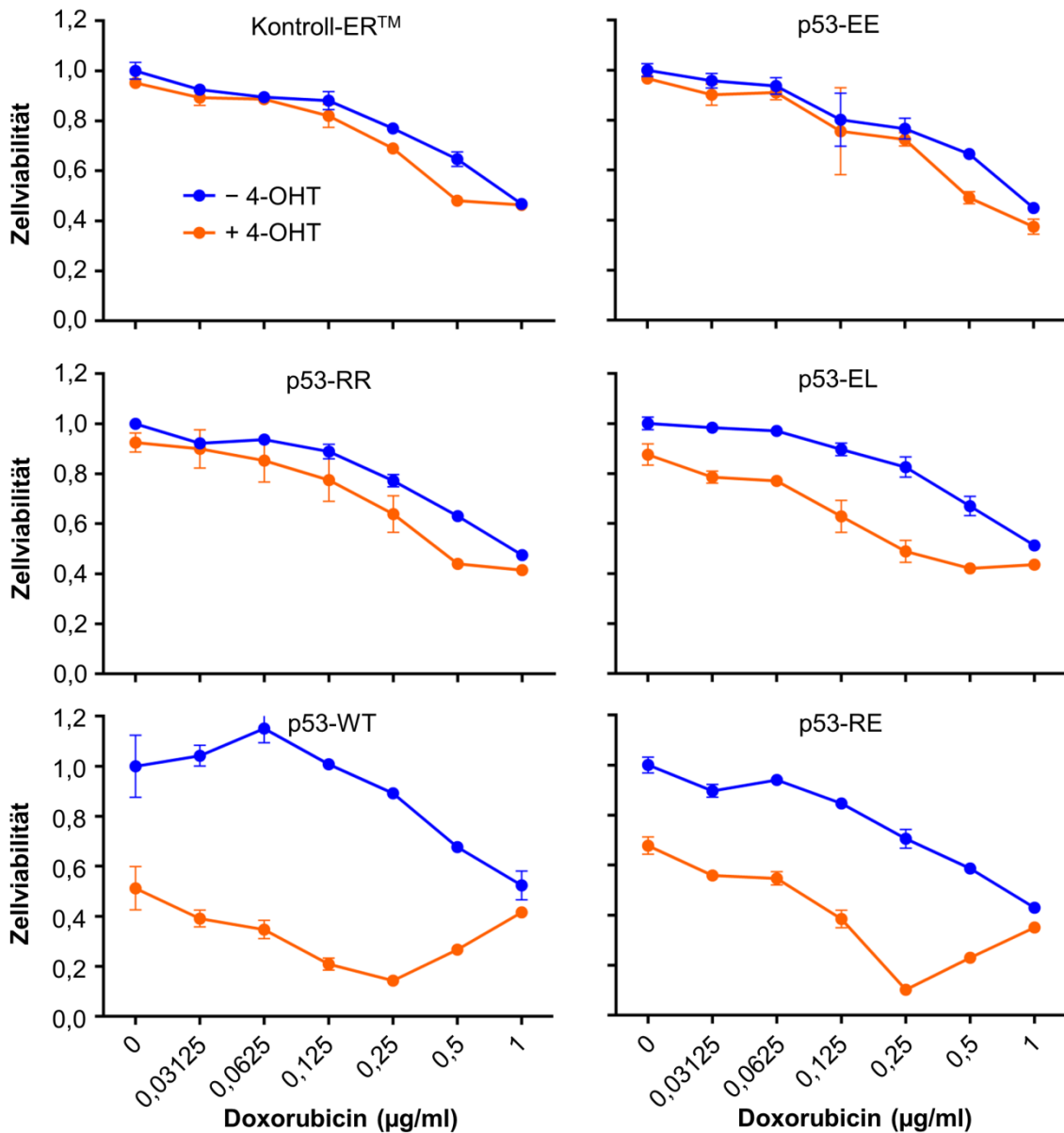


Abb. 5-23: Aktivierung von p53 vermindert die Zellviabilität. Zellen wurden im 96-well Format ausgesät und mit aufsteigenden Konzentrationen von Doxorubicin \pm 4-Hydroxytamoxifen für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter Glo (Promega) gemessen, die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert und in Anteilen daran angegeben. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils 3 Replikaten.

Abb. 5-24 zeigt in anderer Darstellung das Verhalten aller sechs verwendeten Mutanten bei der Behandlung mit 0,25 µg/ml Doxorubicin. Während die alleinige Aktivierung von p53 bei EE und RR keinen, bei EL einen leichten Abfall der Viabilität auslöst, fallen WT und RE deutlich ab, wobei hierbei auffällt, dass die Abnahme beim Wildtyp stärker ausfällt als bei RE. Die gleichzeitige Behandlung mit Doxorubicin kehrt diesen Effekt wieder um und RE zeigt eine stärkere Abnahme als der WT. EE und RR zeigen, wie auch die Kontroll-Zellen ohne p53, keine nennenswerte weitere Abnahme, die über dem vom Doxorubicin alleine induzierten Effekt liegt. Im Falle von EL zeigt sich

ebenfalls eine starke Abnahme der Viabilität bei Behandlung mit 4-OHT und Doxorubicin im Vergleich zu Doxorubicin oder Tamoxifen alleine.

Insgesamt zeigte sich bei diesem Versuch, dass im Gegensatz zu den HR+ Zelllinien die mit den verschiedenen p53 H1-Helix-Mutanten im pCMVneo-Vektor restituierten H1299-Zellen Unterschiede bei Aktivierung von p53 zeigen, die insbesondere für EL, WT und RE gut zu beurteilen sind, während der kurze Versuchszeitraum nicht ausreicht, um beispielsweise einen Effekt von RR zu beobachten. Auffällig ist, dass bei reiner Aktivierung von p53 der WT einen stärkeren Abfall der Viabilität zeigt als die eigentlich stärker Apoptose auslösende Mutante RE.

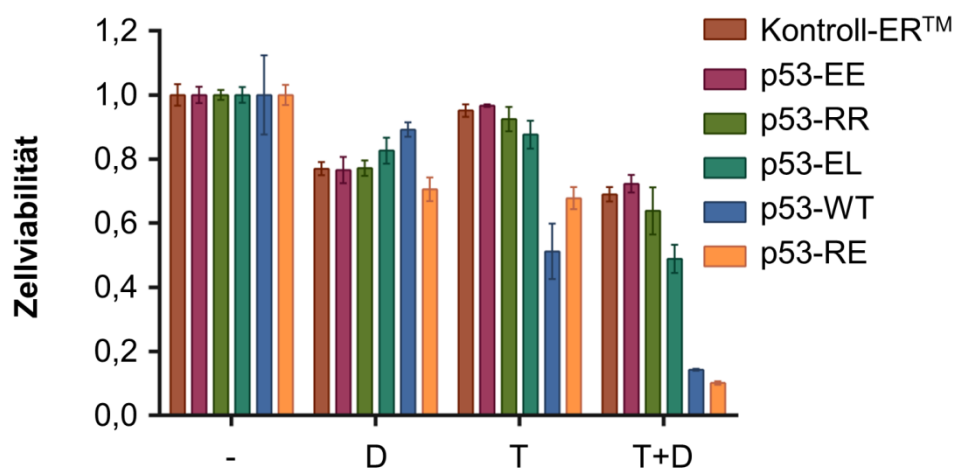


Abb. 5-24: pCMV-Zelllinien zeigen Abnahme der Zellviabilität in Abhängigkeit der Bindungskoooperativität. Zellen wurden im 96-well Format ausgesät und entweder nicht (-) oder mit 4-OHT (T) und/oder 0,25 µg/ml Doxorubicin (D) für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter Glo (Promega) gemessen und die Werte auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD aus jeweils drei Replikaten.

5.3.5 Die Stärke der Kooperativität beeinflusst die Induktion typischer p53-Zielgene auf mRNA-Ebene

Um die Zelllinien eingehender zu charakterisieren, wurde die Transaktivierung typischer p53-Zielgene auf mRNA-Ebene mittels qPCR untersucht. Dazu wurden Zellen für sechs Stunden mit 4-OHT \pm Doxorubicin (0,25 µg/ml) behandelt und anschließend wie unter 4.3 beschrieben die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine qPCR eingesetzt. Es wurden p21^{CDKN1A} und HDM2 als typische anti-apoptotische Zielgene sowie NOXA^{PMAIP1} als typisches über p53 reguliertes pro-apoptotisches Zielgen eingesetzt. Alle Werte wurden auf GAPDH als interne Kontrolle sowie auf die unbehandelte Kontrollgruppe eines jeden Genotyps normalisiert.

p21^{CDKN1A} ist als negativer Regulator der Zellzyklusprogression von unter anderem G1 nach S ein Schlüsselfaktor in der Zellzykluskontrolle. Als transkriptionelles Ziel von

p53 spielt es eine wichtige Rolle für den Zellzyklusarrest in G1 insbesondere nach DNA-Schäden z.B. durch Doxorubicin (Gartel et al., 1996). Es zeigte sich für die Behandlung mit Doxorubicin alleine ein ganz leichter Anstieg der Expression von p21^{CDKN1A} für alle Zelllinien (außer RE). Dies steht im Einklang mit der bereits unter 5.2.9 beobachteten p53-unabhängigen Induktion von p21 bei DNA-Schädigung (Macleod et al., 1995). Auf Aktivierung von p53 durch 4-OHT (T) alleine zeigt sich sowohl in den WT-Zellen als auch bei EL eine Induktion von p21 auf das zweifache der unbehandelten Kontrolle, während in den Kontrollzellen ohne p53 (Kontroll-ER^{TAM}) sowie in EE, RR und RE nicht bis minimal p21 induziert wurde. Bei zusätzlicher Gabe von Doxorubicin kommt es auch durch RR und RE zu einem Anstieg des relativen mRNA-Levels auf das zweifache, während EL und WT einen Anstieg fast bzw. über den dreifachen Level der Kontrollen induzieren.

Das HDM2 Gen codiert für eine E3-Ubiquitin Ligase, die als negativer Regulator von p53 fungiert. Dem Gen kommt damit eine Schlüsselrolle in der Inhibition von p53-vermittelter Apoptose zu (siehe Einleitung). Behandlung mit Doxorubicin alleine zeigte keine Induktion von HDM2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Zugabe von 4-OHT (T) zeigte keinen Effekt in den Kontrollzellen sowie in der funktionell inaktiven Mutante EE, während RR eine Induktion von HDM2 auf das über 2,5-fache auslösen konnte. EL vermochte einen besonders starken Anstieg in der Expression auf das über zwölfwache zu induzieren, WT auf das etwa fünffache und RE auf das etwa dreifache Niveau der Kontrollen. Interessanterweise konnte eine zusätzliche Gabe von Doxorubicin keinen weiteren Anstieg der mRNA-Level von HDM2 induzieren, im Gegenteil war in den EL und WT Zellen sogar eine geringere Induktion (6,85 bzw. 2,85) zu beobachten.

NOXA (PMAIP1) fördert als BH3-only Protein die Aktivierung von Caspasen und führt damit zur Auslösung von Apoptose, dabei wird es von p53 auf transkriptioneller Ebene kontrolliert (Oda et al., 2000a). Die Behandlung mit Doxorubicin alleine führte hier zu einem leichten Anstieg der mRNA-Level in allen Zelllinien auf das 1,5- bis zweifache. Bei Aktivierung von p53 durch 4-OHT konnte insbesondere der WT (3,05) aber auch RE (2,34) eine Induktion von NOXA herbeiführen. Die Aktivierung zusammen mit gleichzeitigen DNA-Schäden durch Doxorubicin führte zu einer Induktion durch WT auf das fünffache, während RE auch hier eine niedrigere Induktion auf das 3,5-fache auslöste. Auch durch RR (2,66) und EL (2,82) kam es zu einer Induktion von NOXA.

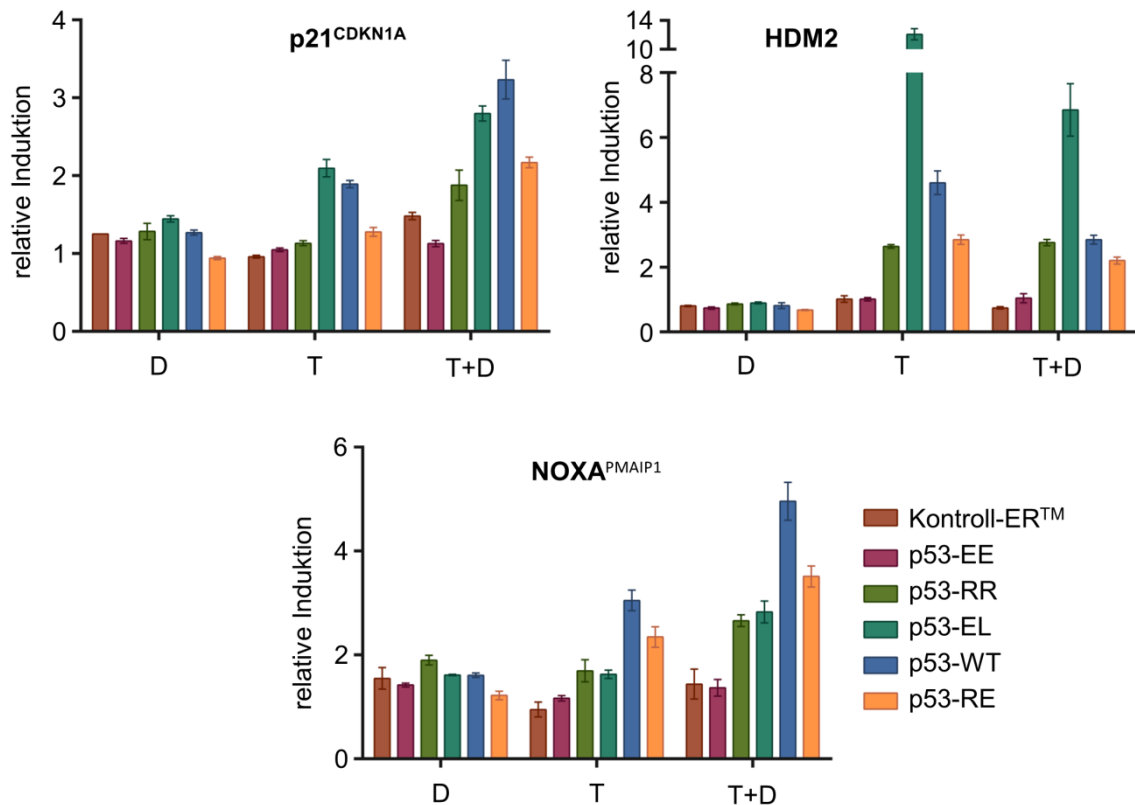


Abb. 5-25: Quantitative Expressionsprofile drei typischer Zielgene von p53. Die angegebenen Zelllinien wurden für sechs Stunden mit 0,25 µg/ml Doxorubicin (D) ± 1 µM 4-OHT (T) behandelt, die RNA extrahiert und mittels quantitativer RT-PCR in Bezug auf die 3 Gene p21^{CDKN1A}, HDM2 und NOXA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung der im 3-fach Ansatz durchgeführten qPCR.

Insgesamt zeigte sich, dass die Expression der p53-Konstrukte in den pCMVneo-Zelllinien ausreichend ist, um typische, repräsentative Zielgene von p53 zu transaktivieren. p53RE, eigentlich eine H1-Helix-Mutation, welche die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden in Richtung Apoptose verschiebt, zeigte hier aber interessanterweise eine niedrigere Induktion von NOXA als der Wildtyp, und das sowohl bei Behandlung mit 4-OHT alleine als auch in der Kombination mit Doxorubicin. Dies geht zum Teil einher mit den Ergebnissen im vorherigen Abschnitt: Auch hier konnte der WT einen stärkeren Abfall der Viabilität induzieren als RE. Ebenfalls beachtenswert ist, dass die Induktion von p21^{CDKN1A} durch p53RR sowohl mit 4-OHT alleine als auch in Kombination kaum über das Niveau der Kontrollzellen ohne p53 hinauskommt. **Abb. 5-25** zeigt die Ergebnisse der q-RT-PCR.

5.3.6 Die Stärke der Kooperativität ist ausschlaggebend für die Induktion typischer p53-Zielgene auf Proteinebene

Da sich auf mRNA-Ebene gezeigt hatte, dass z.B. NOXA als pro-apoptotisches Gen von RE weniger induziert werden konnte als vom WT, und RR die Transkription von p21

nur wenig steigern konnte, wurde überprüft, inwieweit dies auch auf Proteinebene der Fall ist. Hierzu wurden Zellen wiederum mit 4-OHT \pm Doxorubicin (0,25 μ g/ml) behandelt, in diesem Fall für 18 Stunden, geerntet und die Zellextrakte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde ein Immunoblot auf p53, p21 als Zellzyklusarrest auslösendes Protein sowie auf das Spaltprodukt der Poly(ADP-Ribose) Polymerase (cleaved-PARP) als Marker für Apoptose durchgeführt. PARP führt in der Zelle u.a. normalerweise DNA-Reparatur Aufgaben durch und wird während des programmierten Zelltods u.a. durch Caspase-3 gespalten (Gu et al., 1995; Oliver et al., 1998). β -Aktin diene als Ladekontrolle. HCT 116 Zellen mit endogenem p53 wurden als Positivkontrolle mit aufgenommen und mit Nutlin-3 bzw. Doxorubicin behandelt.

Bezüglich der Proteinexpression von p53 zeigte sich nochmals, dass p53-ER^{TAM} im Vergleich zum endogenen p53 aus den HCT 116 Zellen überexprimiert wird. Allerdings zeigte sich in dieser Versuchskonstellation ebenfalls, dass p53RE im Vergleich zu den anderen Mutanten eine etwas geringere Expression aufweist.

Betrachtet man p21, zeigt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene, dass EE in keiner Behandlungskonstellation in der Lage ist, die Proteinexpression zu stimulieren. RR zeigt bereits bei Behandlung mit 4-OHT alleine eine leichte, zusammen mit Doxorubicin dann eine, auch im Vergleich zu den anderen Genotypen, relativ kräftige Induktion von p21. EL und WT können die Expression von p21 in etwa der gleichen Stärke stimulieren, während RE nur eine leichte Induktion im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle erkennen lässt. Allen Zelllinien mit den exogen restituierten p53-Konstrukten ist jedoch gemein, dass sie im Vergleich zum endogenen p53 aus den HCT 116 Zellen p21 deutlich schwächer induzieren, obwohl sich die p53-Spiegel höher darstellen.

Das Spaltprodukt von PARP (cPARP) ist erwartungsgemäß in den p53EE und p53RR exprimierenden Zellen nicht detektierbar, auch nicht bei gleichzeitiger Behandlung mit 4-OHT und Doxorubicin, da EE aufgrund der schwachen DNA-Bindung transkriptionell fast inaktiv ist und auch RR aufgrund der niedrigen Kooperativität nicht in der Lage ist, pro-apoptotische Zielgene zu aktivieren. EL induziert bei Aktivierung durch 4-OHT offensichtlich in geringem Ausmaß Apoptose, reflektiert durch eine sehr geringe Menge cPARP, die im Western Blot detektiert werden konnte. Bei zusätzlicher Behandlung mit Doxorubicin wird das Spaltprodukt von PARP noch deutlicher sichtbar und spiegelt damit gut die Mittelstellung von EL im Spektrum der Kooperativitätsmutanten wieder. Auf der anderen, stärker Apoptose auslösenden Seite dieses Spektrums steht der WT, wiedergespiegelt hier durch eine große Menge an detektierbarem Spaltprodukt von PARP sowohl bei Aktivierung durch Tamoxifen als auch noch stärker bei zusätzlicher Behandlung mit Doxorubicin. Gemessen an dem deutlich niedrigeren basalen Level von p53RE ist

immer noch eine große Menge an cPARP bei Behandlung mit 4-OHT und Doxorubicin im Blot detektierbar.

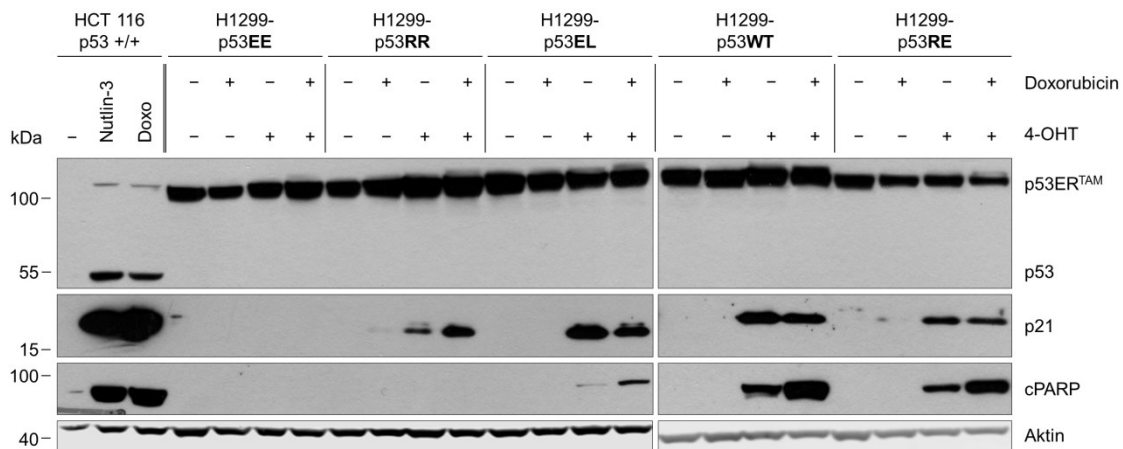


Abb. 5-26: Western Blot auf typische Zielgene von p53. Je 50 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit einem p53-, p21-, cPARP- bzw. Aktin-spezifischen Antikörper.

Vergleicht man die Bande von cPARP, die in den H1299-p53^{WT} bei aktivem p53 und gleichzeitiger DNA-Schädigung mit Doxorubicin sichtbar ist, mit der, die in den ebenfalls mit Doxorubicin behandelten HCT 116 p53 +/+ auftritt, zeigt sich die gleiche Stärke. Dies könnte bedeuten, dass das Ausmaß an ausgelöster Apoptose auf einem sehr ähnlichen Niveau liegt; anders als die zuvor beschriebene schwächere Induktion von p21 als Schlüsselfaktor von Zellzyklusarrest. **Abb. 5-26** zeigt die Ergebnisse des Immunoblots.

5.3.7 Kooperativität ist notwendig, um Apoptose als Reaktion auf DNA-Schäden auszulösen

Auf mRNA Ebene zeigte sich bereits, dass besonders der Wildtyp und RE p53-abhängige, pro-apoptotische Zielgene wie z.B. NOXA transaktivieren. Auf Proteinebene zeigte sich korrespondierend dazu ein erhöhtes Level von cPARP als Marker für ablaufende Apoptose. Um das Ausmaß an Apoptose, welches die verschiedenen Mutanten in den H1299 Zelllinien auslösen können näher zu quantifizieren, wurde durchflusszytometrisch der Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase-3 als zentralem Faktor der Ausführungsphase von Apoptose bestimmt. Die Zellen wurden für 18 Stunden 4-OHT ± Doxorubicin (0,25 µg/ml) behandelt und anschließend mit dem CaspGLOWTM Fluorescein Active Caspase Staining Kit auf aktivierte Caspase-3 gefärbt (siehe 4.1.9).

Aus **Abb. 5-27** wird ersichtlich, dass weder Doxorubicin (D) noch Tamoxifen (T) alleine innerhalb des kurzen Beobachtungszeitraumes (18 Stunden) den Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase-3 erhöhten. Die gleichzeitige Gabe (T+D) induzierte weder bei den Kontrollzellen, noch in Zelllinien mit Mutanten geringer Kooperativität Apoptose.

Lediglich WT (17 %) und RE (7,5 %) lösten bei Aktivierung und gleichzeitigem DNA-Schaden offensichtlich Apoptose aus, ausgedrückt durch den erhöhten Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase-3. Eine hohe Kooperativität ist also notwendig, um als Reaktion auf starken zellulären Stress, hier in Form von durch Doxorubicin induziertem Replikationsstress und DNA-Doppelstrangbrüchen, Apoptose auszulösen.

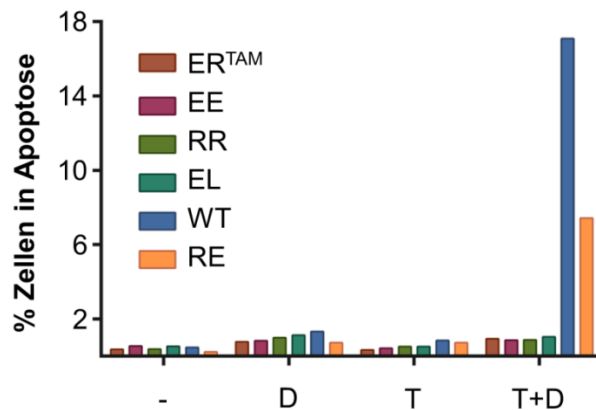


Abb. 5-27: Nur WT und RE lösen Apoptose aus. Zellen wurden für 18 Stunden der angegebenen Behandlung mit Doxorubicin 0,25 µg/ml (D), 100 nM 4-OHT (T) oder beidem (T+D) unterzogen, geerntet, mit dem CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit nach Angaben des Herstellers aktive Caspase-3 angefärbt und durchflusszytometrisch der Anteil an fluoreszierenden Zellen bestimmt.

Auch in diesem Experiment zeigte sich erneut, dass der RE Klon das zelluläre Schicksal weniger in Richtung Apoptose lenkt als der WT.

5.3.8 Die Stärke der Kooperativität beeinflusst das Proliferationsverhalten

Alle bisher beschriebenen Versuche zielten darauf ab, die pCMVneo-Zelllinien zu charakterisieren und unmittelbare Auswirkungen der Aktivierung von p53 zu untersuchen. Durch die Kopplung an die Gaussia-Luziferase (GLuc) besteht jedoch auch die Möglichkeit, das Proliferationsverhalten der Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Zwar stellt GLuc in ihrer Quantität zunächst einmal ein Maß für die Expression von p53 dar (über die T2A-Sequenz wird GLuc stöchiometrisch mitexprimiert und abgespalten), jedoch kann aus ihr ebenfalls eine Aussage über die Quantität der Zellen, in denen sie produziert wird, abgeleitet werden.

Für den Versuch wurden Zellen eines jeden Genotyps jeweils als Duplikate im 6-well Format ausgesät (6000 Zellen/well) und jeweils mit oder ohne 4-Hydroxytamoxifen kultiviert. Alle zwei Tage wurde Medienüberstand entnommen, auf eine 96-well Platte überführt und eingefroren. Am Ende des Versuchszeitraum wurden alle Überstände gleichzeitig auf die Aktivität der GLuc gemessen.

Das Verhalten der Zellen über einen längeren Zeitraum nach Aktivierung von p53 ist in **Abb. 5-28** dargestellt. Die Kontrollzellen ohne p53 (Kontroll-ER^{TAM}) zeigten

unbehandelt wie mit 4-OHT behandelt einen ähnlichen Anstieg der GLuc Aktivität. Das Verhalten der Zellen mit der inaktiven Mutante EE war über den Zeitraum von elf Tagen dem der Kontroll-ER^{TAM} Zellen beinahe identisch; die Aktivierung von p53 hat hier also, wie erwartet, keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten gezeigt. Eine weitere Mutante mit geringer Kooperativität ist RR. Auch hier zeigte sich im Langzeitverhalten kein Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Aktivierung von p53. Die im Kooperativitätsspektrum in der Mitte angesiedelte Mutante EL hingegen wies nach anfänglich gleich starkem Anstieg ab Tag 5 eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich abgeschwächte Proliferationskinetik auf, so dass sich die Kurven am Ende des Beobachtungszeitraumes sehr deutlich unterschieden. Die mit 4-OHT behandelten, WT exprimierenden Zellen unterschieden sich am stärksten von ihrer unbehandelten Kontrolle, bereits zwischen den ersten beiden Messzeitpunkten stagnierte der Anstieg, danach fiel die Aktivität wieder in Richtung null. Für p53RE zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Insgesamt zeigte sich also eine mit steigender Kooperativität abgeschwächte Proliferation der Zellen. Der Status der H1-Helix Mutationen beeinflusst also das langfristige Proliferationsverhalten der hier verwendeten Tumorzellen.

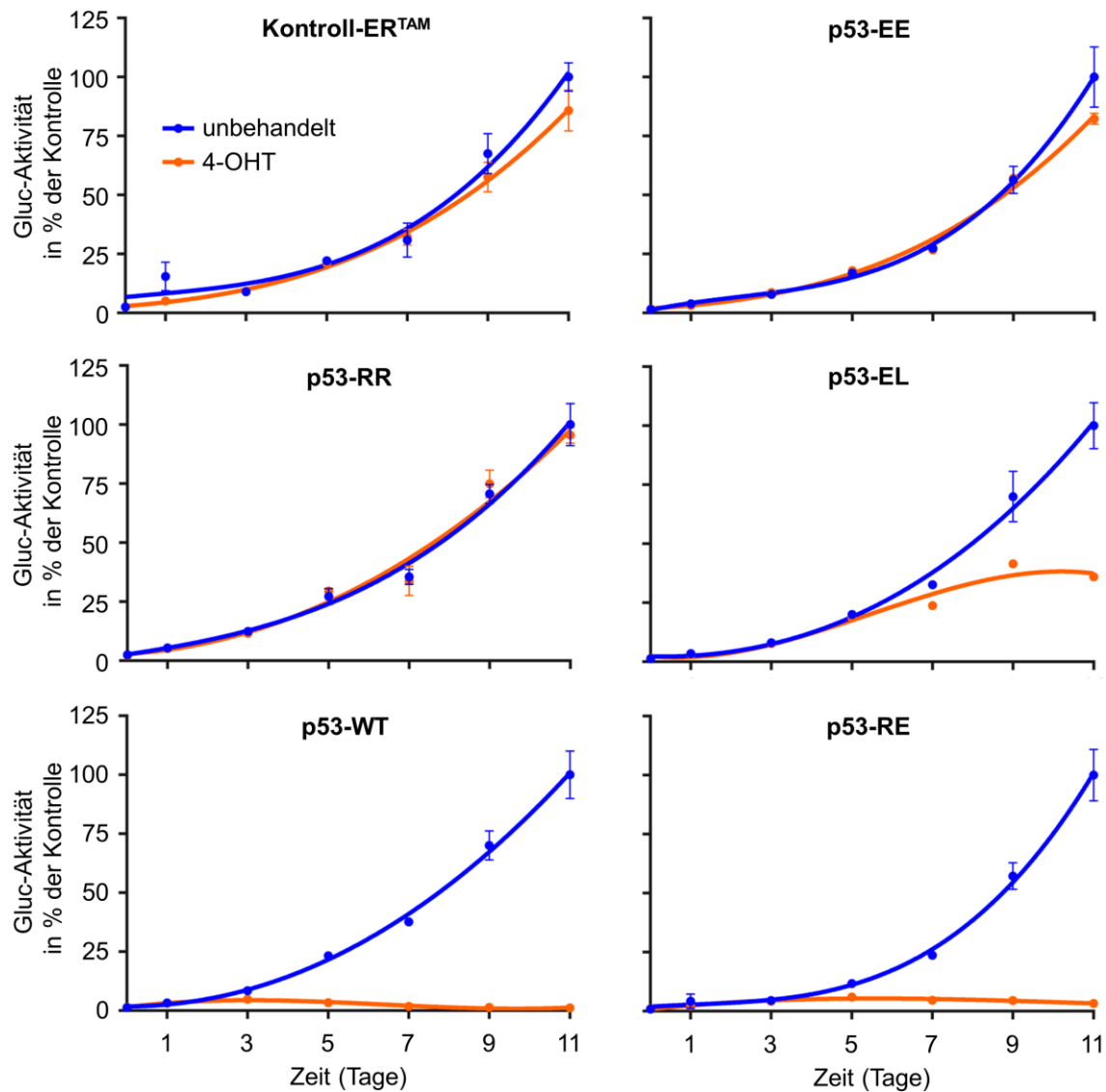


Abb. 5-28: GLuc-Proliferationsassay. Die Zellen mit dem angegebenen p53-Genotyp wurden dünn im 6-well Format ausgesät, zu den angegebenen Zeitpunkten ein Aliquot Medienüberstand aus dem Kulturgefäß entnommen und eingefroren. Am Ende des Versuchszeitraumes wurden alle Medienüberstände aufgetaut und gleichzeitig auf die Aktivität der Gaussia-Luziferase (GLuc) vermessen. Die RLU-Werte wurden jeweils auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert und als prozentualer Anteil daran angegeben. Aufgetragen sind der Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Ansätzen und die Standardabweichung.

Um zu illustrieren, dass anhand der Aktivität der Gaussia-Luziferase eine Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen getroffen werden kann, wurden Zellen zusätzlich in 6-cm Kulturschalen ausgesät, mit oder ohne Tamoxifen kultiviert und die Proliferation beobachtet. Nach zehn Tagen wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Giemsa gefärbt. Im Einklang mit dem gleichförmigen Anstieg der GLuc-Aktivität bei Behandlung \pm 4-OHT (**Abb. 5-28**) zeigte sich bei den EE und RR exprimierenden Zelllinien kein Unterschied in der Zelldichte. Im Kontrast dazu führte die Aktivierung von p53-WT zu einem vollständigen Absterben der Zellen; dies korrespondiert mit dem

Ausbleiben des Anstiegs der GLuc-Aktivität im Proliferationsassay. **Abb. 5-29** zeigt die fixierten und gefärbten Zellen.

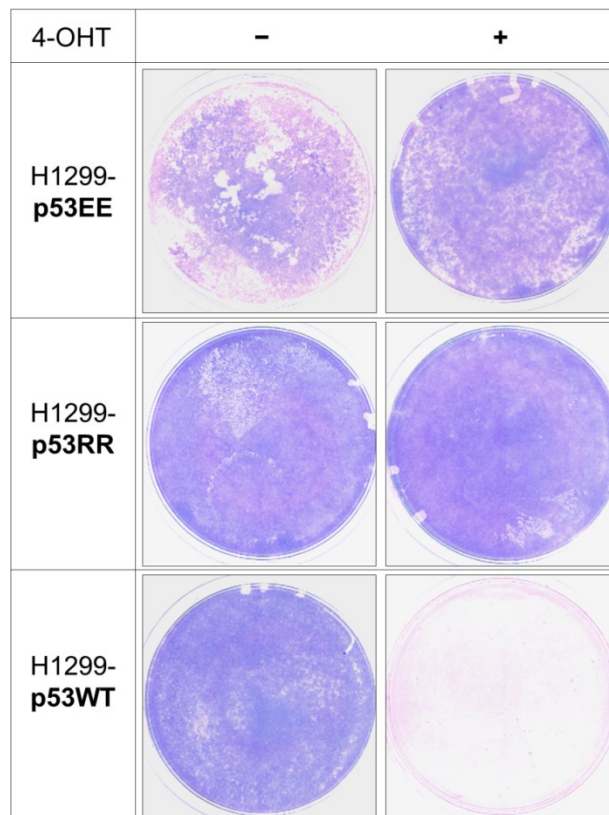


Abb. 5-29: Einfluss der Kooperativität auf die Zellproliferation. Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen ausgesät und zehn Tage mit bzw. ohne 100 nM 4-Hydrotamoxifen kultiviert. Danach erfolgte die Fixation mit 70% Ethanol und die Färbung mit Giemsa.

5.3.9 Gleichmäßigere Expression hebt Einfluss der Kooperativität für das Zellschicksal besser hervor

In den beschriebenen Versuchen zeigte sich, dass der Wildtyp nach genotoxischem Stress mit Doxorubicin stärker als die hoch-kooperative Mutante RE z.B. NOXA als pro-apoptotisches Zielgen aktivieren konnte oder Apoptose induzierte. Im Western Blot (Abb. 5-26) war zu erkennen, dass besonders RE im Vergleich zu den anderen Klonen p53 niedriger exprimiert, was der Grund für die unerwarteten Ergebnisse sein könnte. Ein abgewandelter Satz von im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Klonen (RE 1.7→RE 1.17; WT 1.2→WT 1.23) wurde daraufhin durch Joël Charles erneut untersucht. Dabei zeigte sich zum einen, dass die Expression von p53 nicht stärker ist als die von endogenem, durch Nutlin aktiviertem p53 aus U2OS Zellen (**Abb. 5-30a**), also eine physiologische Situation widerspiegelt. Zum anderen zeigte sich nach 24-stündiger Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxorubicin, dass alle Klone bis auf EE p21 induzieren konnten, die Spaltung von PARP

(→cPARP) als Marker für Apoptose jedoch nur vom WT und, deutlich stärker, von RE ausgelöst wurde (**Abb. 5-30b**).

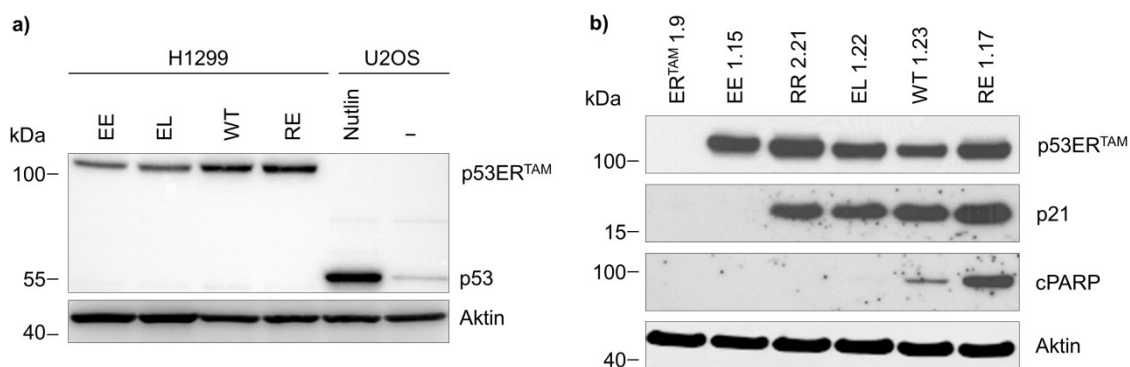


Abb. 5-30: Gleichmäßige Expression ermöglicht bessere Vergleichbarkeit. a) p53 in H1299 wird nicht stärker als endogenes, mit Nutlin aktiviertes p53 aus U2OS Zellen exprimiert. b) p21 als Zielgen für Zellzyklusarrest und cPARP als Marker für Apoptose werden von diesem Satz an Klonen in erwarteter Weise induziert.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der durchflusszytometrischen Messung von apoptotischen (aktivierte-Caspase-3 positiven) Zellen wieder. 24 Stunden nach der Induktion von DNA-Schäden durch Doxorubicin zeigte sich, dass RE in besonders starkem Maße Apoptose auslöste (24 % apoptotische Zellen), WT schon weniger (16,2 %) und EL (3,5 %) nur noch marginal. In allen anderen Proben waren keine apoptotischen Zellen festzustellen. Dieser Satz von Klonen zeigt also bei insgesamt gleichmäßigerer p53 Expression sehr gut, dass mit steigender Kooperativität das Zellschicksal nach genotoxischem Stress immer mehr in Richtung Apoptose gelenkt wird.

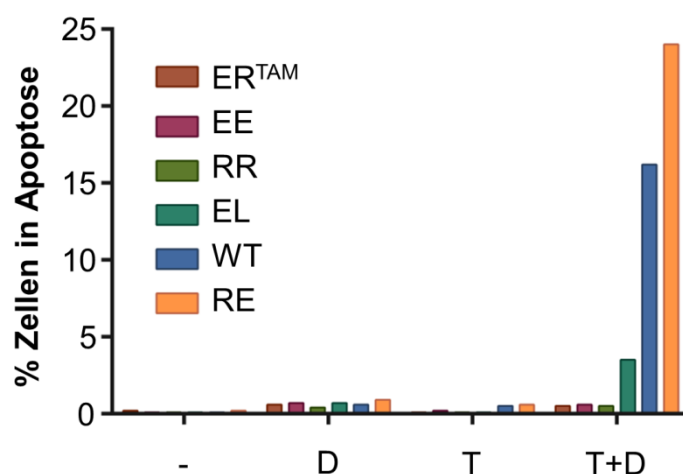


Abb. 5-31: Gleichmäßige Expression hebt den Einfluss steigender Kooperativität auf die Rate an Apoptose hervor. Zellen wurden für 24 Stunden der angegebenen Behandlung mit Doxorubicin 0,5 µg/ml (D), 100 nM 4-OHT (T) oder beidem (T+D) unterzogen, geerntet, mit dem CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit nach Angaben des Herstellers aktive Caspase-3 angefärbt und durchflusszytometrisch der Anteil an fluoreszierenden Zellen bestimmt.

6 Diskussion

6.1 Erfolgreiche Klonierung und Validierung des Expressionssystems

Für die Erstellung eines induzierbaren Expressionssystems, welches die verschiedenen p53 H1-Helix Mutanten gekoppelt an einen modifizierten Östrogenrezeptor sowie an eine Gaussia Luziferase enthält, waren verschiedene Klonierungsschritte notwendig.

p53-ER^{TAM} Fusionsproteine

Die unterschiedlichen p53 Sequenzen konnten dabei in mehreren Schritten erfolgreich an den modifizierten Östrogenrezeptor (Littlewood et al., 1995; Putzer et al., 2000) gekoppelt werden. Die entstehenden Fusionsproteine p53-ER^{TAM} wurden korrekt exprimiert und übten erst nach Zugabe von 100 nM 4-Hydrotamoxifen p53-spezifische Effekte aus. So zeigte sich in mehreren Experimenten, dass die Fusionsproteine über p53-responsive Elemente Zielgene transaktivieren können.

In maligne transformierten Zellen sind zelluläre Signalwege als Antwort auf DNA-Schäden konstitutiv aktiviert (DiTullio et al., 2002; Gorgoulis et al., 2005), zusätzlich herrscht häufig onkogener Stress. Da p53 in solchen Zellen, in diesem Fall je nach Stärke der Kooperativität, sofort nach Restitution p53-abhängige Programme wie Zellzyklusarrest oder Apoptose auslöst, ist die Kopplung an den mit Tamoxifen regulierbaren Östrogenrezeptor ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung des Einflusses der Bindungs Kooperativität in Zellkultur- oder Xenograftstudien. Bei kontinuierlicher Expression von p53 in H1299 Zellen wäre es gar nicht möglich gewesen, die Zellen langfristig zu kultivieren, da (hoch-kooperatives) p53 in diesem Modell sofort nach Expression aktiviert ist und Apoptose auslöst.

Gaussia Luziferase

GLuc konnte erfolgreich hinter die T2A Sequenz kloniert werden und fungierte in dieser Position als Reporter für die Expression von p53-ER^{TAM}, da über die T2A-vermittelte intratranslationelle Abspaltung von GLuc äquimolare Mengen der beiden Proteine exprimiert werden (Ibrahimi et al., 2009). Ebenfalls eignete sich die Kopplung von p53-ER^{TAM} und GLuc beim Screening von Einzelzellklonen auf das Expressionslevel des Konstruktes. Eine Rangfolge der am stärksten exprimierenden Klone anhand des GLuc-Levels konnte im Western Blot auf p53 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

6.2 Meganuklease-vermittelte zielgerichtete Integration

6.2.1 Meganuklease-vermittelte zielgerichtete Integration führte zu niedriger Rate an positiven Klonen in H1299 Zellen

Mittels Meganuclease-vermittelter Genomeditierung wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen, bezüglich der integrierten p53-Konstrukte isogene Zelllinien zu generieren. Dies sollte die optimale Vergleichbarkeit des Einflusses unterschiedlicher Kooperativität auf p53-vermittelte Zellschicksalsentscheidungen ermöglichen und verzerrende Effekte durch unterschiedliche Expression eliminieren. Eine Meganuclease wurde aufgrund ihrer hohen Spezifität bei geringer Toxizität ausgewählt (s.a. Kapitel 2.3.2); zielgerichtete Integration durch Meganuklease-unterstützte homologe Rekombination verspricht eine mono- oder biallelische, stabile Expression des gewünschten Gens vom immer selben Genlokus über multiple Zellpassagen hinweg, auch ohne Selektionsmedium (Cabaniols et al., 2010; Cabaniols und Pâques, 2008; Grizot et al., 2009).

Grizot et al. (2009) beobachteten bei Einsatz der hsRag1 Meganuklease in HEK-293 Zellen eine Rate von 3,2-6,1 % an Zellen, die ohne vorherige Selektion transfizierter Zellen eine Meganuklease vermittelte Geninsertion aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich nach Transfektion der H1299 Zellen noch eine Selektion auf das ebenfalls innerhalb der Homologiekassette liegende Neomycin-Resistenzgen vorgenommen. Auch unter der Annahme, dass die Rate an homologer Rekombination in H1299 Zellen deutlich unter der von Grizot et al. beobachteten 6,1 % liegt, sollte die Quote nach Selektion deutlich höher als die in dieser Arbeit beobachteten null bis vier Prozent liegen.

6.2.2 Mögliche Gründe für die niedrige Rate an homologer Rekombination in H1299

Im Folgenden sollen mögliche Gründe für die beschriebene niedrige Effizienz diskutiert werden.

Krebszellen weisen häufig ausgeprägte epigenetische Veränderungen wie Hypo- und Hypermethylierungen auf, vermittelt durch veränderte DNA-Methyltransferase Aktivität (Baylin et al., 1998; Jones und Baylin, 2002). Hypermethylierungen in den Promotoren von Tumorsuppressorgen führen dabei zur Repression dieser Gene. Epigenetische Modifikationen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Effizienz von Meganukleasen. So zeigte eine Arbeit, dass die DNA-Bindung und damit die Spaltungsaktivität der *I-CreI* Meganuclease durch CpG-Methylierungen an der DNA der Zielsequenz dramatisch abnehmen können (Valton et al., 2012), diese Erkenntnisse konnten für eine weitere Meganuclease bestätigt werden (Dupuy et al., 2013). Eine weitere Studie wies außerdem nach, dass die Schnitteffizienz von Meganukleasen von der Chromatinzugänglichkeit um

die Schnittstelle abhängt und dass diese für den gleichen Lokus in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt ist (Daboussi et al., 2012). Der Status von epigenetischen Modifikationen beeinflusst des Weiteren auch die Zugänglichkeit der DNA-Reparaturmaschinerie zu Doppelstrangbrüchen (Misteli und Soutoglou, 2009). Denkbar ist also, dass durch diese Faktoren die Effizienz der Meganuclease und der homologen Rekombination in H1299 Zellen beeinflusst sein könnte.

Wie besprochen basiert die Meganuclease-vermittelte zielgerichtete Integration auf einem induzierten Doppelstrangbruch mit anschließender Reparatur durch homologe Rekombination. Der DSB wird in der Zelle durch den MRN-Komplex (MRE11–RAD50–NBS1) erkannt und in der Folge die Kinase ATM rekrutiert (Paull und Lee, 2005). Diese phosphoryliert wiederum zahlreiche nachgeschaltete Ziele der Signalkaskade wie BRCA1, welches ein wichtiger Mediator der Initiation von HR ist und u.a. indirekt über die Interaktion mit BRCA2 für die Rekrutierung der für den Ablauf der HR wichtigen Faktoren Rad51 und Rad54 sorgt (Boulton, 2006; Chapman et al., 2012). Die ausreichende Expression und korrekte Funktion dieser Proteine ist also essenziell für die DSB Reparatur durch HR (und damit auch für die Meganuclease-vermittelte zielgerichtete Integration), wie an Brca1- (Moynahan et al., 1999) und Rad54-defizienten (Essers et al., 1997) embryonalen Mausstammzellen nachgewiesen werden konnte. Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie DNA-Reparatur Genen durch Mutation oder Repression stellt einen Selektionsvorteil für Krebszellen dar (s. Kapitel 2.1). Es lässt sich daher spekulieren, dass in den verwendeten H1299 Zellen (die einem nicht-kleinzelligen Lungentumor entstammen) Teile dieses Reparaturapparates nicht korrekt funktionieren und es daher zu der geringen Rekombinationsrate gekommen ist. Tatsächlich konnte für BRCA1 und BRCA2 (Lee et al., 2007; Wang et al., 2008) sowie ATM (Safar et al., 2005) in Gewebeproben von Patientinnen und Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungentumoren eine Repression durch Hypermethylierung nachgewiesen werden. Diese Zusammenhänge lassen daher vermuten, dass die genannten und eventuelle weitere an HR beteiligte Gene in H1299 reprimiert oder mutiert sei könnten.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die geringe Erfolgsrate könnte das Vorhandensein von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) in der Erkennungssequenz der hsRag1-Meganuklease in zumindest einem Allel darstellen.

Da das hsRag1-Meganuklease System bisher nicht an H1299 Zellen angewandt wurde, erscheint es in der Zusammenschau möglich, dass einer oder mehrere der genannten Faktoren sich in dieser Zelllinie ungünstig auf die Aktivität bzw. Effizienz des Enzyms auswirken und damit die geringe Rate an erfolgreicher Rekombination begründen könnten.

Unabhängig von der verwendeten Zelllinie stellt eine zu niedrige Expression der Meganuklease selber einen weiteren Erklärungsansatz dar. Da das Plasmid keinen Reporter trägt und auch keine kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die hsRag1 Meganuklease existieren, war es nicht möglich, die Expression zu überprüfen bzw. zu quantifizieren.

6.2.3 Ansätze zur Erhöhung der Rekombinationsrate

Ausgehend von der beschriebenen Relevanz epigenetischer Modifikationen für die Effizienz von Meganukleasen könnte der Einsatz von demethylierenden Stoffen vor Anwendung der Meganuklease einen Weg darstellen, die Rekombinationsrate zu erhöhen. Der Einsatz von 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) konnte beispielsweise die Rate an HR in 293T-Zellen (induziert durch eine Meganuklease spezifisch für eine Sequenz im XPC-Gen) signifikant erhöhen (Dupuy et al., 2013), was in anderen Kontexten ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Valton et al., 2012).

Ob als Reaktion auf einen DSB NHEJ oder HR abläuft, wird unter anderem auch durch die Zellzyklusphase bestimmt. So kann NHEJ prinzipiell den ganzen Zellzyklus über erfolgen, während HR hauptsächlich in S/G2 stattfindet (Chapman et al., 2012; Rothkamm et al., 2003; Saleh-Gohari und Helleday, 2004). Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass die Synchronisation von Zellen durch einen 30-stündigen G2/M-Arrest durch Vinblastin die Rate an Nuclease-induzierter homologer Rekombination um das Fünffache erhöhen konnte (Urnov et al., 2005). Eine weitere Studie wies eine starke lineare Korrelation zwischen der Anzahl an Zellen in der S-Phase und der Rate an homologer Rekombination – gemessen durch ein GFP-Reporter System – nach (Hartlerode et al., 2011). Die Synchronisation von Zellen durch G2/M-Arrest oder S-Phasen Arrest durch Thymidin könnte daher einen weiteren, interessanten Ansatz darstellen, um die Rekombinationsrate zu erhöhen.

In einer Hochdurchsatz-Studie konnten durch den Einsatz von siRNAs 64 Gene identifiziert werden, deren *knock-down* die Rate an homologer Rekombination steigerte. Der stärkste Effekt zeigte sich dabei für das Gen ATF7IP, welches im Chromatin-Umbau involviert ist (Delacôte et al., 2011). Die gleichzeitige Transfektion von siRNA gegen dieses Gen könnte daher auch zu einer erhöhten Effizienz in diesem Falle beitragen.

6.2.4 Fehlerhafte Gegenselektion mit Ganciclovir als möglicher Grund für fehlende Isogenität

Die nach Abschluss des PCR Screenings erhaltenen Klone wiesen insbesondere zwei Merkmale auf: Zum einen zeigten sie deutliche Unterschiede in der Expression von p53 (Abb. 5-15), waren also nicht isogen bezüglich des integrierten Konstruktes, zum anderen erwies sich die Expression des Konstruktes als sehr niedrig, besonders im Vergleich zur physiologischen Expression in HCT 116 Zellen (Abb. 5-16). Die fehlende Isogenität kann

eigentlich nur über zusätzliche zufällige Integration des Plasmids an andere Stellen im Genom erklärt werden, jedoch wurde mittels des außerhalb der homologen Region liegenden HSV-TK Suizidgens und Ganciclovir (GCV) eine Gegenselektion auf genau diese zufälligen Ereignisse vorgenommen. Daher besteht die Möglichkeit, dass diese Gegenselektion nicht für alle Klone funktioniert hat. Das von ca. 300 getesteten Klonen nur fünf PCR positiv waren, passt zu dieser These. Zudem wiesen auch die in der PCR nicht positiv getesteten Klone eine niedrige Expression auf. Daher wäre ein denkbare Szenario, dass die Expression der HSV-TK zu niedrig war, um ausreichende Mengen von GCV in das aktive GCV-Triphosphat umzuwandeln. Umgekehrt könnte auch die eingesetzte Konzentration von 30 μM GCV zu niedrig gewesen sein, um auch Klone mit niedriger Expression zu erfassen. In der Literatur zeigten sich auch Konzentrationen von bis zu 100 μM ohne gleichzeitige Expression der HSV-TK als nicht toxisch für H1299 Zellen. Wenn eine Thymidinkinase exprimiert wurde, unterschied sich die EC_{50} aber zum Teil deutlich, je nach eingesetztem Promotor schwankte sie zwischen ein und 100 μM (Fong et al., 2011; Hong et al., 2014; Poulsen et al., 2008). Die Literaturdaten zeigen also, dass bei einer gegebenen Konzentration von GCV das Expressionslevel der HSV-TK entscheidend für den toxischen Effekt sein kann. Möglicherweise hätte eine genauere Anpassung der Dosis an H1299 Zellen eine bessere Selektion ermöglichen können. Zusätzlich könnte ein Southern Blot genauere Aufschlüsse über die tatsächliche Anzahl der integrierten Konstrukte im Genom liefern.

6.2.5 Fazit und Ausblick

Es zeigte sich bei der näheren Charakterisierung der HR+ Zelllinien, dass auch bei zeitgleichem DNA-Schaden und Aktivierung von p53 p21 als typisches Zielgen nicht hochreguliert werden konnte. Als Konsequenz daraus zeigten sich auch bei einer Untersuchung der Zellviabilität keine Effekte, die auf die unterschiedlichen p53 Mutanten zurückzuführen wären. Es bleibt daher festzuhalten, dass sich die durch den Versuch der Geninsertion durch zielgerichtete Integration generierten HR+ Zelllinien nicht für die Untersuchung des Einflusses der DNA-Bindungs Kooperativität auf Zellschicksal eignen.

Eine These für die nicht vorhandene Isogenität ist die Existenz zusätzlicher zufälliger Integrationen in das Genom. Trotz dieser (eventuell vorhandenen) zusätzlichen Kopien erwies sich die Expression der Konstrukte als sehr niedrig. Es lässt sich daher spekulieren, ob ein artifizielles Konstrukt mit p53-cDNA bei Integration an nur einen Genlokus überhaupt stark genug exprimiert wird, zudem unterliegt es kaum den physiologischen Regelmechanismen. Einen anderen möglichen Ansatz könnte daher eine Modifikation von Tumorzellen mit wildtypischem p53 darstellen (z.B. HCT 116 Kolonkarzinomzellen). Die in der Einleitung beschriebenen TALENs oder besonders das erst kürzlich breiter in der

Literatur beschriebene CRISPR/Cas9-System (Sander und Joung, 2014) könnten genutzt werden, die H1-Helix in endogenem p53 zu mutieren und so ein physiologisches Modell zu etablieren. Dies wäre allerdings mit einem hohen Aufwand verbunden.

6.3 Zur Etablierung eines NSCLC-Zellkulturmodells

6.3.1 Der Einfluss der p53 DNA Bindungskooperativität auf das Zellschicksal im NSCLC-Zellkulturmodell

Die generierten Zelllinien zeigten im Gegensatz zu den durch zielgerichtete Integration hergestellten durch den starken CMV-Immediate-early Promotor eine gute Expression der Konstrukte und nach Aktivierung von p53 starke, p53- und kooperativitätsabhängige Effekte. So induzierte die Aktivierung von p53 EL, RE und WT eine deutliche Abnahme der Viabilität, welche sich mit steigenden Konzentrationen von Doxorubicin bis 0,25 µg/ml weiter verstärkte (siehe 5.3.4). Die Mutanten mit geringerer Kooperativität lösten indes keine Abnahme der Lebendzellzahl aus. In den darauffolgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten mit einer präferenziellen Aktivierung/Induktion von Zielgenen, die mit einem bestimmten zellulären Outcome verknüpft sind, einhergeht.

Induktion von pro-Arrest Genen

Alle Mutanten mit Ausnahme von EE konnten p21^{CDKN1A} auf mRNA Ebene in der Reihenfolge WT=EL>RE=RR induzieren, wobei die Induktion nach Behandlung mit Doxorubicin stärker ausfiel. Für Hdm2 erfolgte die Induktion in der Reihenfolge EL>WT>RR=RE. EL als Mutante mit mittlerer Kooperativität kann also noch effizient Schlüsselgene für Zellzyklusarrest transaktivieren, während RE als Mutante mit hoher Kooperativität diese nur schwach induzieren kann. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von Schlereth et al. (2010a). In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass RE die Promotoren dieser Gene zwar effizient bindet, aber weniger RNA Polymerase II an den Transkriptionsstartpunkt gebunden wurde. Die Autoren schlugen einen relativen Mangel an Co-Aktivatoren der Transkription durch die gleichzeitige Bindung von RE an deutlich mehr Stellen im Genom als RR oder EL als eine mögliche Erklärung dafür vor. Auf Proteinebene zeigte sich ebenfalls, dass die Mutanten mit geringer Kooperativität die Menge an p21 ähnlich oder stärker als die Mutanten mit hoher Kooperativität erhöhen konnten. Auffällig jedoch, dass besonders für RR ein zusätzlicher DNA-Schaden als Stimulus für erhöhte p21 Level notwendig war. Des Weiteren wurde deutlich, dass keine der Mutanten, obwohl im Vergleich zu endogenem p53 deutlich überexprimiert, das Level

an p21 erreichte, welches in HCT 116 Zellen durch endogenes p53 induziert wurde (Abb. 5-26).

Induktion des pro-apoptotischen Genes NOXA

In der Reihenfolge WT>RE>EL>RR induzierten die H1-Helix Mutanten die Transkription von NOXA. Unterstützend dazu zeigte sich in der Untersuchung von cPARP als Marker für Apoptose auf Proteinebene, dass nur WT und RE deutlich Apoptose induzieren konnten, interessanterweise auf gleichem Niveau wie endogenes p53 in HCT 116. EL zeigte ebenfalls noch eine Restaktivität, während RR überhaupt keine Apoptose auslösen konnte. Zusammengefasst konnte nur zum Teil reproduziert werden, dass höhere Kooperativität mit verstärkter Transaktivierung einhergeht, wie von Schlereth et al. (2010a) gezeigt wurde, da RE hier weniger Effekte zeigte als der Wildtyp.

Kooperativität zeigt Einfluss auf die Proliferation

Bei der Untersuchung der mittelfristigen Auswirkung der H1-Helix-Interaktionen auf die Proliferation zeigte sich eine mit steigender Kooperativität reduzierte Kinetik (Abb. 5-28). Der Status der H1-Helix Mutationen beeinflusste das langfristige Proliferationsverhalten der hier verwendeten Tumorzellen.

Aktiviertes p53RR als Mutante mit der niedrigsten Kooperativität, welche noch Funktionalität aufweist, beeinflusste die Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle jedoch nicht. Für RR wurde jedoch gezeigt, dass es Zellzyklusarrest und Seneszenz in vivo induzieren kann (Timofeev et al., 2013). Wahrscheinlich ist, dass in diesem Modell die alleinige Aktivierung von p53RR nicht ausreichend ist, um ausreichende Level an pro-Arrest Genen zu induzieren. qPCR und Western Blot bestätigten diese Vermutung und wiesen ebenfalls nach, dass eine Behandlung mit Doxorubicin zu deutlich robusterer Induktion führte. p53EL zeigte hingegen im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich verminderte Proliferation mit entsprechend höherem Level an p21. p53WT und RE verhinderten die Proliferation fast komplett. In anderen Versuchen induzierten diese beiden Mutanten starke Verminderung der Zellviabilität (Abb. 5-24), hohe Level an Apoptose (Abb. 5-27) und Induktion von NOXA (Abb. 5-25), was dieses Verhalten erklärt.

6.3.2 Genotoxischer Zellstress führt zu stärkeren p53-abhängigen Zellschicksalsentscheidungen

Die gleichzeitige Gabe von Doxorubicin bewirkte zumeist eine Verstärkung der jeweiligen p53-abhängigen Zellantwort, z.B. eine stärkere Induktion von p21 und NOXA auf Protein- und mRNA-Ebene, eine stärkere Abnahme der Zellviabilität oder durchflusszytometrisch messbare Capase-3-Aktivierung durch die entsprechenden Mutanten. Besonders für p53RR als Mutante mit limitiertem Zielgenspektrum zeigte sich,

dass die zusätzliche Behandlung notwendig ist, um eine robuste Induktion von p21 zu erreichen. Die verwendete Konzentration von 0,25 µg/ml konnte dies bewirken, allerdings zeigte sich diese Konzentration p53-unabhängig als so toxisch, dass im Langzeitversuch alle Zellen abstarben (Daten nicht gezeigt), vermutlich über p53-unabhängige Apoptose durch hohe Level an reaktiven Sauerstoffspezies (Tsang et al., 2003). Für weitere Versuche sollte daher entweder für Doxorubicin evaluiert werden, ob niedrigere Konzentrationen noch p53-abhängige Zellantworten verstärken können oder andere genotoxische und/oder nicht genotoxische Mittel verwendet werden. Mögliche Mittel wären hierbei z.B. 5-FU und Cisplatin oder auch Nutlin als nicht-genotoxisches p53-stabilisierendes Agens.

6.3.3 Unterschiedliche Expressionsniveaus der H1-Helix-Mutanten beeinflussen das Zellschicksal

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Zelllinien zeigten u.a., dass RE in geringerem Maße als WT NOXA induziert, cPARP-Level steigert oder Apoptose auslöst. Dies steht nicht im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über hoch-kooperatives p53, denn dieses kann auch weniger perfekte p53-responsive Elemente binden, welche sich vor allem vor pro-apoptotischen Genen finden. Im gleichen Maße wie die Kooperativität steigt, verschiebt sich das zelluläre Schicksal als Reaktion auf genotoxischen Stress daher in Richtung Apoptose (Schlereth et al., 2010a; Schlereth et al., 2010b). Die nach der Selektion erhaltenen Klone wurden anhand der Aktivität der GLuc auf die Expression der Konstrukte hin untersucht (Abb. 5-21). Die anhand dieser Daten ausgewählten Klone unterschieden sich in der Expression maximal um den Faktor 1,55. Die niedrigere Expression von RE wurde besonders im Western Blot deutlich und korrelierte dort auch mit einer im ähnlichen Maßstab verringerten Detektion von cPARP (Abb. 5-26). Ähnliches zeigte sich für die Induktion von NOXA. Obwohl die Expressionsniveaus also nicht besonders stark voneinander abweichen, hat sie einen starken Einfluss auf das zelluläre Outcome und maskiert den Einfluss der Bindungskoopertivität zumindest im Falle von RE. Anhand der im Nachhinein erhobenen Daten von Joel Charles (siehe 5.3.9) zeigte sich aber, dass dieses Zellkulturmodell bei Klonen mit exakter angepasster Expression den Einfluss der p53 DNA Bindungskoopertivität gut abbilden kann und damit für weiterführende Experimente sehr gut geeignet ist.

6.3.4 Limitationen des Modells

Insgesamt eignet sich das Modell bei Auswahl von gleichmäßig exprimierenden Klonen gut für weitergehende Analysen der Kooperativität (näheres siehe Ausblick). Allerdings liegen auch einige Limitationen vor.

p53 wird überexprimiert

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klone zeigten eine Überexpression von p53, welche die Analysemöglichkeiten im Rahmen der Langzeit-Proliferationsversuche einschränkte. So übte die Aktivierung von p53^{WT} und RE alleine im Kontext von H1299 Zellen bereits starke zytotoxische Effekte aus und lies alle Zellen absterben. Dies verhinderte die Untersuchung des Einflusses der Kooperativität bei gleichzeitiger Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen (wie hier Doxorubicin) bei diesen Mutanten. Es ist bekannt, dass der Umstand hoher p53 Proteinlevel alleine zu Apoptose führt (Chen et al., 1996), vermutlich in dem eine sogenannte „apoptotische Schwelle“ – eine feine Balance aus anti- und proapoptotischen Faktoren – überschritten wird. Steigende p53 Level verschieben das Gleichgewicht dabei zu den proapoptotischen Faktoren (Kracikova et al., 2013). Auch die direkte transkriptions-unabhängige Aktivierung von Bax durch große Mengen an p53 tragen vermutlich zur starken Zytotoxizität in diesem Modell bei (Chipuk et al., 2004).

Die Auswahl von anderen Klonen zeigte aber, dass sich eine physiologische Konstellation herstellen lässt (siehe 5.3.9), in der die Expression von p53ER^{TAM} der von Nutlin-induziertem p53 in U2OS Zellen entspricht.

Klone sind nicht isogen

Auch bei vorsichtiger Auswahl von Klonen, die die Konstrukte möglichst in gleicher Stärke exprimieren, wird mit konventioneller Transfektion und Selektion keine Isogenität zu erreichen sein, sodass expressionsbedingte Effekte den Einfluss der Bindungskoopertivität verzerren könnten. Auch unterschiedliche Genloci, die unter dem Einfluss anderer regulatorischer Elemente stehen, könnten zu verzerrenden Effekten führen. Diese Effekte können, wie in dieser Arbeit beschrieben, so stark sein, dass das zelluläre Outcome im jeweiligen Vergleich mit den anderen Klonen weniger in eine bestimmte Richtung (z.B. Apoptose) verschoben ist (vgl. auch 6.3.3). Durch die Kopplung von p53 an GLuc steht aber in Verbindung mit der Detektion von p53 auf Proteinebene ein gutes Werkzeug zur Verfügung, diese Unterschiede zu nivellieren. Die von Joel Charles (5.3.9) so ausgewählten Klone zeigen dies.

6.3.5 Zusammenfassung und Stärken des Modells

Mit dem regulierbaren und kontrollierbaren p53-Expressionssystem in mit einem Luziferase-Reporter markierten Zellen eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms konnte ein Modell etabliert werden, welches sich sehr gut für weitere Studien der p53 DNA Bindungskoopertivität eignet. Dabei bietet die Möglichkeit des Ein- und Ausschaltens von p53 über Tamoxifen einige Vorteile. Zum einen wird so die Kultivierung in Zellkultur und eine Xenotransplantation in Rag2^{-/-}; γ c^{-/-} Mäuse ermöglicht, da konstitutiv exprimiertes p53

hoher Kooperativität in den verwendeten H1299 Zellen schnell Apoptose auslöst. Zum anderen lässt sich der Einfluss von p53 respektive der jeweiligen Kooperativitätsmutante auf Behandlungen mit p53-modulierenden oder DNA-schädigenden Substanzen durch Kontrollen ohne aktiviertes p53 gut abgrenzen; in Xenograft-Modellen könnte das gezielte Aktivieren und Deaktivieren von p53 direkt den Einfluss auf Tumorstadiumskurven (hier messbar durch die Cypridina-Luziferase) erkennen lassen.

Auch die Kopplung von p53 an GLuc sowie die konstitutive Expression von CLuc durch die Zellen selber bietet Vorteile. Die Überwachung der p53 Expression durch GLuc ermöglicht die Beurteilung der Proliferation und Reaktion auf die Aktivierung von p53 (siehe 5.3.8), während die Messung der CLuc Aktivität im Xenograft-Modell zur Überwachung des Tumorstadiums genutzt werden könnte. Das Zusammenspiel der Überwachung der p53-Expression mit der Messung der Zellzahl/des Tumorstadiums über CLuc erlaubt das Erkennen eines möglichen Verlusts der p53-Expression im Rahmen längerfristiger Therapie- und Proliferationsstudien in Xenograft-Modellen.

6.4 Ausblick

Wie in der Einleitung dargestellt, ist p53 der wohl wichtigste Tumorsuppressor in eukaryotischen Zellen. Als Transkriptionsfaktor reguliert er die Expression von einer immensen Anzahl an Genen, welche in den verschiedensten Regulationsprozessen in der Zelle involviert sind. Auch wenn durch kontinuierliche Forschung die Anzahl und Funktionen der bekannten von p53 regulierten Gene stetig zunehmen, bleiben die Auslösung von Zellzyklusarrest, Apoptose oder Seneszenz – je nach Zell- und Gewebekontext – wesentliche Funktionen, die zur Tumorsuppression beitragen. Wie p53 zwischen den Zielgenen entscheidet und somit das Zellschicksal in diese unterschiedlichen Richtungen lenken kann bleibt Gegenstand der Forschung. Die Erkenntnisse zur kooperativen DNA Bindung der p53-Tetramere konnten bereits prägend zu dieser Debatte beitragen, indem gezeigt werden konnte, dass diese entscheidend für die Tumorsuppression und zur Auslösung von Apoptose ist. Die Studien mit der p53^{E177R} (RR) Maus konnten zeigen, dass diese kooperativitätsreduzierende Mutation auch *in vivo* zu einem selektiven Apoptosedefekt bei erhaltenem Einfluss auf Zellzykluskontrolle, Glukosemetabolismus und Schutz vor oxidativem Stress führt (s. 2.2.6 und Timofeev et al., 2013). Weitere Studien mit Knock-In Mäusen, die kooperativitätsverstärkende Mutationen tragen werden folgen. Unterstützend dazu böten sich Studien mit Xenograft-Modellen mit dem im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten System an. Folgende Fragestellungen könnten dabei beispielsweise relevant werden:

- Welchen Einfluss hat die Kooperativität auf das Zellschicksal *in vivo*? Nach initialem Wachstum der Tumoren Aktivierung von p53 über Tamoxifen sowie Behandlung mit genotoxischem Agens (z.B. Doxorubicin, Cisplatin) für ein bis zehn Tage; dann histologische bzw. immunhistochemische Untersuchung auf Apoptose (z.B. mit Tunel-Färbung, Cleaved-Caspase-3-Antikörper) und Seneszenz (SA- β -Galaktosidase-Färbung) sowie qPCR Untersuchung von Tumorgewebe auf die Induktion von Genen für Zellzyklusarrest (p21, 14-3-3) und Apoptose (Puma, Noxa, Bax).
- Ist Apoptose in diesem Modell entbehrlich, um das Tumorstadium einzudämmen? Langzeituntersuchung des Einflusses der Kooperativität auf das Tumorstadium unter Chemotherapie (z.B. mit Doxorubicin).
- Kann eine Behandlung mit Nutlin in Zellen mit niedrig-kooperativem p53 verstärkt Seneszenz induzieren? Als Inhibitor der p53-Mdm2 Interaktion (Vassilev et al., 2004) stabilisiert Nutlin p53 und induziert – je nach Zellkontext – häufig Zellzyklusarrest und Seneszenz (Efeyan et al., 2007; París et al., 2008). Kann Nutlin in Zellen mit hoch-kooperativem p53 umgekehrt verstärkt Apoptose induzieren?

Die therapeutische Modulation der p53 DNA Bindungs Kooperativität könnte einen interessanten Ansatz in der Tumorthherapie darstellen. Eine verstärkte, über-physiologische Kooperativität lenkt das zelluläre Schicksal insbesondere unter akutem DNA-Stress in Richtung Apoptose. Zwar mehren sich die Hinweise darauf, dass diese für die tumorsuppressive Funktion von p53 zumindest in bestimmten Kontexten entbehrlich sein könnte (Timofeev et al., 2013; Van Nguyen et al., 2007; Valente et al., 2013), jedoch kann für den Erfolg einer Chemotherapie, und damit der Tumorelimination, Apoptose das entscheidende Outcome darstellen (Khoo et al., 2014). Eine p53-reaktivierende Therapie, beispielsweise mit Inhibitoren der p53-Mdm2 Interaktion, könnte – bei gleichzeitig erhöhter Kooperativität – aber auch die sonst notwendige zusätzliche Gabe von genotoxischen Chemotherapeutika entbehrlich machen und so eine Alternative mit möglicherweise geringeren Nebenwirkungen darstellen. Aber auch eine Modulation der Kooperativität in die andere Richtung stellt einen interessanten Ansatz dar: die Induktion von Seneszenz mit darauffolgender Entfernung der seneszenten Zellen durch das Immunsystem (Xue et al., 2007) kann sowohl zur Tumorregression durch eine Chemotherapie führen als auch eine Barriere für die Tumorentstehung darstellen. Das Zellschicksal also durch verminderte Kooperativität in Richtung Seneszenz zu treiben stellt eine ebenso attraktive Idee dar. Zusätzlich könnte dies ebenfalls einen Ansatz zur Reduzierung der oft starken und für die Patientinnen und Patienten unangenehmen Nebenwirkungen darstellen, da es so nicht zu exzessiver Apoptose kommt.

Weitere p53-basierte antitumoröse Therapien sind denkbar und/oder Gegenstand aktueller Forschung. Zahlreiche p53-reaktivierende und –modulierenden Substanzen sind zum Teil bereits in klinischer Erprobung (Übersicht in Khoo et al., 2014). Die Mechanismen p53-basierter Zellschicksalsentscheidungen zu verstehen, ist dabei von substanzieller Bedeutung, weshalb die weitere Erforschung der p53 DNA Bindungskoooperativität – als ein Modulator dieser Entscheidungen – vorangetrieben werden sollte. Xenograft-Studien mit dem in dieser Arbeit entwickelten System können dazu einen Beitrag leisten.

7 Literaturverzeichnis

Arnould, S., Chames, P., Perez, C., Lacroix, E., Duclert, A., Epinat, J.C., Stricher, F., Petit, A.S., Patin, A., Guillier, S., *et al.* (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J Mol Biol* 355, 443-458.

Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G.H., and Smith, J. (2011). The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel* 24, 27-31.

Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K., and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-915.

Balagurumoorthy, P., Lindsay, S.M., and Harrington, R.E. (2002). Atomic force microscopy reveals kinks in the p53 response element DNA. *Biophys Chem* 101-102, 611-623.

Balagurumoorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., and Harrington, R.E. (1995). Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8591-8595.

Balmain, A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 1, 77-82.

Barese, C.N., Krouse, A.E., Metzger, M.E., King, C.A., Traversari, C., Marini, F.C., Donahue, R.E., and Dunbar, C.E. (2012). Thymidine kinase suicide gene-mediated ganciclovir ablation of autologous gene-modified rhesus hematopoiesis. *Mol Ther* 20, 1932-1943.

Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M., and Issa, J.P. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-196.

Beno, I., Rosenthal, K., Levitine, M., Shaulov, L., and Haran, T.E. (2011). Sequence-dependent cooperative binding of p53 to DNA targets and its relationship to the structural properties of the DNA targets. *Nucleic Acids Res* 39, 1919-1932.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107-120.

- Bergamaschi, D., Samuels, Y., O'Neil, N.J., Trigiante, G., Crook, T., Hsieh, J.K., O'Connor, D.J., Zhong, S., Campargue, I., Tomlinson, M.L., *et al.* (2003). iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 33, 162-167.
- Bieging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14, 359-370.
- Bioresearch, C. (2010). cGPS Custom Human Guidelines.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bishop, J.M. (1981). Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23, 5-6.
- Boch, J. (2011). TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol* 29, 135-136.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512.
- Boulton, S.J. (2006). Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 34, 633-645.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J Cell Sci* 123, 2527-2532.
- Brady, C.A., Jiang, D., Mello, S.S., Johnson, T.M., Jarvis, L.A., Kozak, M.M., Kenzelmann Broz, D., Basak, S., Park, E.J., McLaughlin, M.E., *et al.* (2011). Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* 145, 571-583.
- Cabaniols, J.P., Ouvry, C., Lamamy, V., Fery, I., Craplet, M.L., Moulharat, N., Guenin, S.P., Bedut, S., Nosjean, O., Ferry, G., *et al.* (2010). Meganuclease-driven targeted integration in CHO-K1 cells for the fast generation of HTS-compatible cell-based assays. *J Biomol Screen* 15, 956-967.
- Cabaniols, J.P., and Pâques, F. (2008). Robust cell line development using meganucleases. *Methods Mol Biol* 435, 31-45.
- Capecchi, M.R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5, 70-76.
- Carvajal, L.A., and Manfredi, J.J. (2013). Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep* 14, 414-421.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47, 497-510.

- Charles, J.P., Fuchs, J., Hefter, M., Vischedyk, J.B., Kleint, M., Vogiatzi, F., Schafer, J.A., Nist, A., Timofeev, O., Wanzel, M., *et al.* (2014). Monitoring the dynamics of clonal tumour evolution in vivo using secreted luciferases. *Nat Commun* **5**, 3981.
- Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* **10**, 2438-2451.
- Chevalier, B.S., and Stoddard, B.L. (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* **29**, 3757-3774.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* **13**, 994-1002.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346-355.
- Choi, Y.J., Lin, C.P., Ho, J.J., He, X., Okada, N., Bu, P., Zhong, Y., Kim, S.Y., Bennett, M.J., Chen, C., *et al.* (2011). miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* **13**, 1353-1360.
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J.F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 1968-1973.
- Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B., and Evan, G.I. (2006). The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* **443**, 214-217.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**, 51-57.
- Craig, A.L., Burch, L., Wojtesek, B., Mikutowska, J., Thompson, A., and Hupp, T.R. (1999). Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem J* **342** (Pt 1), 133-141.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* **358**, 502-511.

- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., *et al.* (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 11-19.
- Daboussi, F., Zaslavskiy, M., Poirrot, L., Loperfido, M., Gouble, A., Guyot, V., Leduc, S., Galetto, R., Grizot, S., Oficjalska, D., *et al.* (2012). Chromosomal context and epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing by rare-cutting designer endonucleases. *Nucleic Acids Res* 40, 6367-6379.
- Das, S., Raj, L., Zhao, B., Kimura, Y., Bernstein, A., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2007). Hzf Determines cell survival upon genotoxic stress by modulating p53 transactivation. *Cell* 130, 624-637.
- Dehner, A., Klein, C., Hansen, S., Müller, L., Buchner, J., Schwaiger, M., and Kessler, H. (2005). Cooperative binding of p53 to DNA: regulation by protein-protein interactions through a double salt bridge. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 5247-5251.
- DeKolver, R.C., Choi, V.M., Moehle, E.A., Paschon, D.E., Hockemeyer, D., Meijnsing, S.H., Sancak, Y., Cui, X., Steine, E.J., Miller, J.C., *et al.* (2010). Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res* 20, 1133-1142.
- Delacôte, F., Perez, C., Guyot, V., Miconio, C., Potrel, P., Cabaniols, J.P., Delenda, C., Pâques, F., and Duchateau, P. (2011). Identification of genes regulating gene targeting by a high-throughput screening approach. *J Nucleic Acids* 2011, 947212.
- DíTullio, R.A., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J., and Halazonetis, T.D. (2002). 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* 4, 998-1002.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576-578.
- Donnelly, M.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., and Ryan, M.D. (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol* 82, 1013-1025.
- Dupuy, A., Valton, J., Leduc, S., Armier, J., Galetto, R., Gouble, A., Lebuhotel, C., Stary, A., Pâques, F., Duchateau, P., *et al.* (2013). Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALEN™. *PLoS One* 8, e78678.

- Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., and Serrano, M. (2006). Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* **443**, 159.
- Efeyan, A., Ortega-Molina, A., Velasco-Miguel, S., Herranz, D., Vassilev, L.T., and Serrano, M. (2007). Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res* **67**, 7350-7357.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-49.
- Essers, J., Hendriks, R.W., Swagemakers, S.M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* **89**, 195-204.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- Fong, V., Osterbur, M., Capella, C., Kim, Y.E., Hine, C., Gorbunova, V., Seluanov, A., and Dewhurst, S. (2011). Adenoviral vector driven by a minimal Rad51 promoter is selective for p53-deficient tumor cells. *PLoS One* **6**, e28714.
- Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* **12**, 2866-2871.
- Gartel, A.L., Serfas, M.S., and Tyner, A.L. (1996). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* **213**, 138-149.
- Giaccone, G., Battey, J., Gazdar, A.F., Oie, H., Draoui, M., and Moody, T.W. (1992). Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res* **52**, 2732s-2736s.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., *et al.* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907-913.
- Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2010). p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001040.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Grizot, S., Smith, J., Daboussi, F., Prieto, J., Redondo, P., Merino, N., Villate, M., Thomas, S., Lemaire, L., Montoya, G., *et al.* (2009). Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. *Nucleic Acids Res* **37**, 5405-5419.

- Gu, B., and Zhu, W.G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci* 8, 672-684.
- Gu, Y., Sarnecki, C., Aldape, R.A., Livingston, D.J., and Su, M.S. (1995). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J Biol Chem* 270, 18715-18718.
- Hadfield, C., Jordan, B.E., Mount, R.C., Pretorius, G.H., and Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 18, 303-313.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harms, K.L., and Chen, X. (2006). The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ* 13, 890-897.
- Hartlerode, A., Odate, S., Shim, I., Brown, J., and Scully, R. (2011). Cell cycle-dependent induction of homologous recombination by a tightly regulated I-SceI fusion protein. *PLoS One* 6, e16501.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-1795.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.
- Hong, I.S., Lee, H.Y., and Kim, H.P. (2014). Novel therapeutic approaches for various cancer types using a modified sleeping beauty-based gene delivery system. *PLoS One* 9, e86324.
- Ibrahimi, A., Vande Velde, G., Reumers, V., Toelen, J., Thiry, I., Vandeputte, C., Vets, S., Deroose, C., Bormans, G., Baekelandt, V., *et al.* (2009). Highly efficient multicistronic lentiviral vectors with peptide 2A sequences. *Hum Gene Ther* 20, 845-860.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* 20, 1331-1340.

- Jacquier, A., and Dujon, B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* *41*, 383-394.
- Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* *12*, 224-228.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S., and Pavletich, N.P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* *267*, 1498-1502.
- Jiang, D., Brady, C.A., Johnson, T.M., Lee, E.Y., Park, E.J., Scott, M.P., and Attardi, L.D. (2011). Full p53 transcriptional activation potential is dispensable for tumor suppression in diverse lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 17123-17128.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2008). Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* *77*, 557-582.
- Johnson, T.M., Hammond, E.M., Giaccia, A., and Attardi, L.D. (2005). The p53^{QS} transactivation-deficient mutant shows stress-specific apoptotic activity and induces embryonic lethality. *Nat Genet* *37*, 145-152.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* *3*, 415-428.
- Jordan, J.J., Menendez, D., Inga, A., Nouredine, M., Nourredine, M., Bell, D.A., Bell, D., and Resnick, M.A. (2008). Noncanonical DNA motifs as transactivation targets by wild type and mutant p53. *PLoS Genet* *4*, e1000104.
- Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 49-55.
- Khoo, K.H., Hoe, K.K., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov* *13*, 217-236.
- Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1156-1160.
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T.E., and Shakked, Z. (2006). Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell* *22*, 741-753.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G., *et al.* (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* *173*, 533-544.

- Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8, 877-884.
- Kracikova, M., Akiri, G., George, A., Sachidanandam, R., and Aaronson, S.A. (2013). A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death Differ* 20, 576-588.
- Kuribayashi, K., Kringsfeld, G., Wang, W., Xu, J., Mayes, P.A., Dicker, D.T., Wu, G.S., and El-Deiry, W.S. (2008). TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol Ther* 7, 2034-2038.
- Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., *et al.* (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* 127, 775-788.
- Lee, M.N., Tseng, R.C., Hsu, H.S., Chen, J.Y., Tzao, C., Ho, W.L., and Wang, Y.C. (2007). Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, 832-838.
- Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R., and Gu, W. (2012). Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* 149, 1269-1283.
- Lin, C.P., Choi, Y.J., Hicks, G.G., and He, L. (2012). The emerging functions of the p53-miRNA network in stem cell biology. *Cell Cycle* 11, 2063-2072.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., and Evan, G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.
- Liu, D.e.a. (2003). Cationic transfection lipids. *Current Medicinal Chemistry* 10: 1307-1315.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9, 935-944.
- Malecka, K.A., Ho, W.C., and Marmorstein, R. (2009). Crystal structure of a p53 core tetramer bound to DNA. *Oncogene* 28, 325-333.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* 7, 1765-1771.

- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* *312*, 1650-1653.
- Matsuda, K., Yoshida, K., Taya, Y., Nakamura, K., Nakamura, Y., and Arakawa, H. (2002). p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res* *62*, 2883-2889.
- McLure, K.G., and Lee, P.W. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J* *17*, 3342-3350.
- McMahon, M.A., Rahdar, M., and Porteus, M. (2012). Gene editing: not just for translation anymore. *Nat Methods* *9*, 28-31.
- Mellert, H., and Espinosa, J.M. (2013). Tumor suppression by p53: is apoptosis important or not? *Cell Rep* *3*, 1335-1336.
- Misteli, T., and Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 243-254.
- Moody, T.W., Berna, M.J., Mantey, S., Sancho, V., Ridnour, L., Wink, D.A., Chan, D., Giaccone, G., and Jensen, R.T. (2010). Neuromedin B receptors regulate EGF receptor tyrosine phosphorylation in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* *637*, 38-45.
- Moore, J.K., and Haber, J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *16*, 2164-2173.
- Morbitzer, R., Römer, P., Boch, J., and Lahaye, T. (2010). Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 21617-21622.
- Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* *326*, 1501.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* *4*, 511-518.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., and Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* *39*, 9283-9293.

- Nakajima, Y., Kobayashi, K., Yamagishi, K., Enomoto, T., and Ohmiya, Y. (2004). cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 565-570.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 220-228.
- Nikulenkov, F., Spinnler, C., Li, H., Tonelli, C., Shi, Y., Turunen, M., Kivioja, T., Ignatiev, I., Kel, A., Taipale, J., *et al.* (2012). Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death Differ* 19, 1992-2002.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000a). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., *et al.* (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G., and Murcia, J.M. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 273, 33533-33539.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001008.
- Osborn, M.J., Panoskaltsis-Mortari, A., McElmurry, R.T., Bell, S.K., Vignali, D.A., Ryan, M.D., Wilber, A.C., McIvor, R.S., Tolar, J., and Blazar, B.R. (2005). A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system. *Mol Ther* 12, 569-574.
- París, R., Henry, R.E., Stephens, S.J., McBryde, M., and Espinosa, J.M. (2008). Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation. *Cell Cycle* 7, 2427-2433.
- Paull, T.T., and Lee, J.H. (2005). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4, 737-740.
- Petty, R.D., Sutherland, L.A., Hunter, E.M., and Cree, I.A. (1995). Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 10, 29-34.

- Phelps, R.M., Johnson, B.E., Ihde, D.C., Gazdar, A.F., Carbone, D.P., McClintock, P.R., Linnoila, R.I., Matthews, M.J., Bunn, P.A., Jr., Carney, D., *et al.* (1996). NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. *J Cell Biochem Suppl* 24, 32-91.
- Poulsen, T.T., Pedersen, N., Juel, H., and Poulsen, H.S. (2008). A chimeric fusion of the hASH1 and EZH2 promoters mediates high and specific reporter and suicide gene expression and cytotoxicity in small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 15, 563-575.
- Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science* 336, 1440-1444.
- Putzer, B.M., Stiewe, T., Crespo, F., and Esche, H. (2000). Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther* 7, 1317-1325.
- Pâques, F., and Duchateau, P. (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 7, 49-66.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 402-412.
- Rippin, T.M., Freund, S.M., Veprintsev, D.B., and Fersht, A.R. (2002). Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding. *J Mol Biol* 319, 351-358.
- Rosen, L.E., Morrison, H.A., Masri, S., Brown, M.J., Springstubb, B., Sussman, D., Stoddard, B.L., and Seligman, L.M. (2006). Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. *Nucleic Acids Res* 34, 4791-4800.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., and Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 5706-5715.
- Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 14, 8096-8106.
- Ruiz-Ruiz, C., Robledo, G., Cano, E., Redondo, J.M., and Lopez-Rivas, A. (2003). Characterization of p53-mediated up-regulation of CD95 gene expression upon genotoxic treatment in human breast tumor cells. *J Biol Chem* 278, 31667-31675.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11, 1306-1313.

- Safar, A.M., Spencer, H., Su, X., Coffey, M., Cooney, C.A., Ratnasinghe, L.D., Hutchins, L.F., and Fan, C.Y. (2005). Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. *Clin Cancer Res* 11, 4400-4405.
- Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32, 3683-3688.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8, 781-794.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32, 347-355.
- Schlereth, K., Beinoraviciute-Kellner, R., Zeitlinger, M.K., Bretz, A.C., Sauer, M., Charles, J.P., Vogiatzi, F., Leich, E., Samans, B., Eilers, M., *et al.* (2010a). DNA binding cooperativity of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 38, 356-368.
- Schlereth, K., Charles, J.P., Bretz, A.C., and Stiewe, T. (2010b). Life or death: p53-induced apoptosis requires DNA binding cooperativity. *Cell Cycle* 9, 4068-4076.
- Schlereth, K., Heyl, C., Krampitz, A.M., Mernberger, M., Finkernagel, F., Scharfe, M., Jarek, M., Leich, E., Rosenwald, A., and Stiewe, T. (2013). Characterization of the p53 cistrome--DNA binding cooperativity dissects p53's tumor suppressor functions. *PLoS Genet* 9, e1003726.
- Schmitt, M.W., Prindle, M.J., and Loeb, L.A. (2012). Implications of genetic heterogeneity in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1267, 110-116.
- Seligman, L.M., Chisholm, K.M., Chevalier, B.S., Chadsey, M.S., Edwards, S.T., Savage, J.H., and Veillet, A.L. (2002). Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. *Nucleic Acids Res* 30, 3870-3879.
- Serrano, M. (2011). Cancer: final act of senescence. *Nature* 479, 481-482.
- Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.
- Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., and Pâques, F. (2011). Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* 11, 11-27.
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J.C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F.J., Bravo, J., *et al.* (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res* 34, e149.

- Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., and Kucherlapati, R.S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* *317*, 230-234.
- Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A.W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L.I., Myers, R.H., Lindquist, S., *et al.* (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* *146*, 318-331.
- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* *7*, 165-168.
- Swindle, C.S., and Klug, C.A. (2002). Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors. *J Hematother Stem Cell Res* *11*, 449-456.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., and Dass, C.R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* *65*, 157-170.
- Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y., and Yoshida, K. (2007). DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* *25*, 725-738.
- Takimoto, R., and El-Deiry, W.S. (2000). Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* *19*, 1735-1743.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* *24*, 827-839.
- Tannous, B.A. (2009). Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. *Nat Protoc* *4*, 582-591.
- Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* *11*, 435-443.
- Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D., and Liu, L.F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* *226*, 466-468.
- Tidow, H., Melero, R., Mylonas, E., Freund, S.M., Grossmann, J.G., Carazo, J.M., Svergun, D.I., Valle, M., and Fersht, A.R. (2007). Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12324-12329.
- Timofeev, O., Schlereth, K., Wanzel, M., Braun, A., Nieswandt, B., Pagenstecher, A., Rosenwald, A., Elsässer, H.P., and Stiewe, T. (2013). p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. *Cell Rep* *3*, 1512-1525.

- Tsang, W.P., Chau, S.P., Kong, S.K., Fung, K.P., and Kwok, T.T. (2003). Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci* 73, 2047-2058.
- Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., and Holmes, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646-651.
- Valente, L.J., Gray, D.H., Michalak, E.M., Pinon-Hofbauer, J., Egle, A., Scott, C.L., Janic, A., and Strasser, A. (2013). p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep* 3, 1339-1345.
- Valton, J., Daboussi, F., Leduc, S., Molina, R., Redondo, P., Macmaster, R., Montoya, G., and Duchateau, P. (2012). 5'-Cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation impacts the activity of natural and engineered meganucleases. *J Biol Chem* 287, 30139-30150.
- van den Bosch, M., Lohman, P.H., and Pastink, A. (2002). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 383, 873-892.
- Van Nguyen, T., Puebla-Osorio, N., Pang, H., Dujka, M.E., and Zhu, C. (2007). DNA damage-induced cellular senescence is sufficient to suppress tumorigenesis: a mouse model. *J Exp Med* 204, 1453-1461.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302, 1036-1038.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 275-283.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.
- Vousden, K.H., and Ryan, K.M. (2009). p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9, 691-700.
- Wang, S., Konorev, E.A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., and Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem* 279, 25535-25543.

- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., and Harris, C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3706-3711.
- Wang, Y., Zhang, D., Zheng, W., Luo, J., Bai, Y., and Lu, Z. (2008). Multiple gene methylation of nonsmall cell lung cancers evaluated with 3-dimensional microarray. *Cancer* *112*, 1325-1336.
- Weinberg, R.A. (2014). *The Biology of Cancer* (Garland Science).
- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (2005). Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J Mol Biol* *348*, 589-596.
- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B., and Fersht, A.R. (2004). Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol* *341*, 1145-1159.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* *7*, 1126-1132.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656-660.
- Zeitlinger, M. (2013). Die DNA-Bindungskoopertivität ist entscheidend für die Tumorsuppressoraktivität von p53. In *Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie* (Marburg: Philips-Universität Marburg).
- Zhang, M., Wang, F., Li, S., Wang, Y., Bai, Y., and Xu, X. (2014). TALE: a tale of genome editing. *Prog Biophys Mol Biol* *114*, 25-32.
- Zhang, X.P., Liu, F., Cheng, Z., and Wang, W. (2009). Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 12245-12250.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1	Eigenschaften und Fähigkeiten, die Krebszellen auszeichnen.....	6
Abb. 2-2	Schematischer Aufbau des p53 Proteins.....	8
Abb. 2-3	Struktur der p53 Konsensussequenz.....	9
Abb. 2-4	Struktur eines tetrameren p53 DBD-DNA Komplexes.....	10
Abb. 2-5	Intra-dimerische H1-Helix Interaktionen.....	11
Abb. 2-6	Spektrum von p53 H1-Helix Mutanten mit veränderter Kooperativität....	12
Abb. 2-7	Das p53 Netzwerk.....	14
Abb. 2-8	Kooperativität erweitert das Zielgenspektrum von p53.....	17
Abb. 2-9	Genomeditierung durch Nuklease-induzierte Doppelstrangbrüche.....	21
Abb. 3-1	Nukleinsäure- und Proteinmarker	32
Abb. 4-1	Schematische Darstellung der Funktionsweise des cellular Genome Positioning Systems (cGPS®).....	38
Abb. 4-2	Schema der PCR zur Identifizierung von HR+ Klonen.....	39
Abb. 4-3	Funktionsweise der sequenzspezifischen Rekombination.....	46
Abb. 5-1	Design des Expressionssystems.....	53
Abb. 5-2	Klonierung des 5'-Anteils des Östrogen-Rezeptors.....	54
Abb. 5-3	Klonierung des 3'-Anteils des Östrogen-Rezeptors.....	55
Abb. 5-4	Klonierung der Gaussia-Luziferase (GLuc)	56
Abb. 5-5	Generierung des Plasmids pENTR4-ER ^{TAM} -T2A-GLuc.....	57
Abb. 5-6	Klonierung der p53 H1-Helix-Mutanten.....	58
Abb. 5-7	Restriktionsanalyse von pENTR4-p53EE.ER ^{TAM} -T2A-Gluc.....	58
Abb. 5-8	Umwandlung der cGPS-Integrationsmatrix in einen Gateway- <i>Destination</i> -Vektor.....	60
Abb. 5-9	Schema der LR-Reaktion.....	60
Abb. 5-10	Agarosegel der korrekt transformierten Klone nach LR-Reaktion.....	61
Abb. 5-11	p53-ER ^{TAM} wird in HEK293-Zellen korrekt exprimiert.....	62
Abb. 5-12	Gaussia Luziferase wird aus allen Konstrukten exprimiert.....	62
Abb. 5-13	Luziferase Reporter Assay.....	64
Abb. 5-14	Validierungs-PCR zur Identifizierung von HR+ Klonen.....	65
Abb. 5-15	HR+-Zelllinien weisen unterschiedliche p53-Proteinlevel auf.....	66
Abb. 5-16	HR+ Klone können p21 nicht aktivieren.....	67
Abb. 5-17	HR+ Zellen zeigen keine Unterschiede in der Zellviabilität bei Behandlung mit 4-OHT ± Doxorubicin.....	68
Abb. 5-18	Schema der Klonierung des Vektor pCMVneo-p53-ER ^{TAM} -T2A-Gluc....	70
Abb. 5-19	Agarosegel nach Verdau der isolierten Plasmide mit EcoRI.....	71

Abb. 5-20	Western Blot zur Kontrolle der Expression von p53.....	71
Abb. 5-21	Auswahl von Klonen.....	73
Abb. 5-22	Western Blot zur Validierung der ausgewählten Klone.....	73
Abb. 5-23	Aktivierung von p53 vermindert die Zellviabilität.....	75
Abb. 5-24	pCMV-Zelllinien zeigen Abnahme der Zellviabilität in Abhängigkeit der Bindungskoopertivität.....	76
Abb. 5-25	Quantitative Expressionsprofile drei typischer Zielgene von p53.....	78
Abb. 5-26	Western Blot auf typische Zielgene von p53.....	80
Abb. 5-27	Nur WT und RE lösen Apoptose aus.....	81
Abb. 5-28	GLuc-Proliferationsassay.....	83
Abb. 5-29	Einfluss der Kooperativität auf die Zellproliferation.....	84
Abb. 5-30	Gleichmäßige Expression ermöglicht bessere Vergleichbarkeit.....	85
Abb. 5-31	Gleichmäßige Expression hebt den Einfluss steigender Kooperativität auf die Rate an Apoptose hervor.....	85

9 Anhang

Lebenslauf

[-entfernt-]

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Adamkiewicz, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Braun, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Eilers, Fendrich, Fuchs-Winkelmann, Graz, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hassan, Hegele, Hertl, Heverhagen, Hofmann, Jaques, Kircher, Klose, König, Koolman, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Maschuw, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Opitz, Plant, Renz, Richter, Schäfer, Schmidt, Stiewe, Suske, Tackenberg, Timofeev, Vogelmeier, Wagner, Wanzel, Westermann, Wilhelm und Wulf.

Meine akademischen Lehrer in Gießen waren die Herren Riße und Knipper.

Meine akademischen Lehrer in Kassel waren die Herren Hillejan, Höpfner und Löser.

Meine akademischen Lehrer in Berlin waren die Damen und Herren Mackert und Rasch.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Thorsten Stiewe für die Möglichkeit danken, bei ihm promovieren und die praktische Arbeit in seinem Labor durchführen zu dürfen, sowie für die gute Betreuung und die ruhige, nette und konstruktive Art.

Ich danke Dr. Oleg Timofeev für seine Geduld und Unterstützung bei der Einführung in die Welt der Molekularbiologie und Wissenschaft, seine exzellenten fachlichen Tipps, die ständige Bereitschaft zur kritischen Diskussion sowie für die Durchsicht dieses Manuskriptes.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Stiewe, die mich in meiner Zeit im Labor mit viel Hilfe, Nachsicht (mit dem x-ten Mediziner, der nichts findet, alles am falschen Ort abstellt und auch noch seinen Labordienst vergisst) und Humor begleitet haben: Joel, Fotini, Jeanette, Anne, Anna, Michael, Katha, Miriam, Marlen, Marie, Philip, Antje, Sigrid, Martina, Elisabeth, Mirjam und Jonas.

Vielen Dank an Michi und Basti für die orthographische Kontrolle.

Was hätte ich ohne den Renthof 20, Top Floor D, der besten WG aller Zeiten gemacht? Danke für die Abende nach den langen Labor- und UB-Tagen, für Euch und die geniale Zeit!

Danke Derya für deine ständige Unterstützung und das Ertragen meiner Nörgeleien über diese Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem ganzen Lebensweg liebevoll unterstützt, mir trotzdem immer alle Freiheiten gegeben haben und so neben dieser Arbeit an noch vielen weiteren Dingen ihren Anteil haben!

Ehrenwörtliche Erklärung

[-entfernt-]